

THÈSES

présentées à la
FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS
pour l'obtention du
GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(Doctorat d'Etat)

par

Claude HELLEU

Pharmacien-Biologiste

PREMIÈRE THÈSE

**Détermination Chimique et Microbiologique
de l'Inositol Urinaire chez l'Homme**

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

présentées et soutenues le

1957 devant la Commission d'Examen

JURY

{

MM. J.-E. COURTOIS, Président.

Y. RAOUL, Professeur.

P. MALANGEAU, Maître de Conférences.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551514_0073

THÈSES

présentées à la
FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS
pour l'obtention du
GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(Doctorat d'Etat)

par

Claude HELLEU

Pharmacien-Biologiste

PREMIÈRE THÈSE

**Détermination Chimique et Microbiologique
de l'Inositol Urinaire chez l'Homme**

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

présentées et soutenues le

1957 devant la Commission d'Examen

JURY

MM. J.-E. COURTOIS, Président.

Y. RAOUL, Professeur.

P. MALANGEAU, Maître de Conférences.

A LA MÉMOIRE DE MES PREMIERS MAÎTRES :

Le Professeur Gustave ROUSSY (†)

Recteur de l'Université de Paris

Le Professeur Marc TIFFENEAU (†)

Doyen de la Faculté de Médecine de Paris

A Monsieur le Professeur R. FABRE

Doyen de la Faculté de Pharmacie de Paris

Membre de l'Institut

Membre de l'Académie de Médecine

Commandeur de la Légion d'Honneur

qui nous a utilement conseillé, et nous a
toujours marqué un intérêt bienveillant.

Hommage de respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Professeur P. FLEURY

Professeur honoraire à la Faculté de Pharmacie

Membre de l'Académie de Médecine

Officier de la Légion d'Honneur

qui nous a le premier accueilli dans son
Laboratoire, et a toujours suivi nos
travaux avec intérêt.

En témoignage de notre respectueuse gratitude.

A Monsieur le Professeur J.-E. COURTOIS

Professeur à la Faculté de Pharmacie

Pharmacien des Hôpitaux de Paris

Chevalier de la Légion d'Honneur

qui nous a confié le sujet de cette thèse
et a dirigé tous nos travaux.

En témoignage de notre profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Y. RAOUL
Professeur à la Faculté de Pharmacie

qui nous a fait l'honneur de faire partie
de notre jury.

Hommage respectueux.

A Monsieur le Professeur R. TRUHAUT
Professeur à la Faculté de Pharmacie
Directeur des Recherches à l'Institut Gustave-Roussy
Chevalier de la Légion d'Honneur

qui nous a initié à la recherche scientifique
et dont nous avons eu l'honneur d'être l'assistant.

Avec notre respectueux souvenir et nos
sentiments de sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur-agrégé P. MALANGEAU
Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie
Pharmacien des Hôpitaux Psychiâtriques de la Seine

qui nous a très utilement conseillé pour une partie
de nos travaux.

En témoignage de sincère reconnaissance.

A Monsieur R. PERLÈS
Assistant à la Faculté de Pharmacie
Ex-attaché de Recherches au C.N.R.S.

qui nous a fait bénéficier de ses précieux
conseils techniques.

Avec tous nos remerciements.

A ma Femme,

A mes Parents,

En témoignage de ma vive affection.

MEIS ET AMICIS

INTRODUCTION

L'inositol fut isolé pour la première fois par SCHERER en 1850 à partir du muscle de bœuf.

En 1856, il y a donc exactement cent ans, CLOETTA, après avoir extrait l'inositol du rein du bœuf, le retrouvait également dans une urine d'homme atteint de mal de Bright. Ainsi se trouvait posé le problème de « l'inosurie » (terme créé par GALLOIS en 1864 dans sa thèse de Médecine).

Depuis cette date l'inositol, et le problème de l'inosurie en particulier, ont donné lieu à un certain nombre de recherches dont P. FLEURY et P. BALATRE ont fait le point vers 1947 dans deux publications extrêmement documentées (12, 13). On trouvera dans ces publications toutes les notions concernant la chimie et la biochimie des inositols, accompagnées d'une importante bibliographie.

Nous nous contenterons donc de rappeler ici très brièvement les principales étapes de ces recherches, afin de mieux situer dans leur cadre nos travaux personnels.

HISTORIQUE

Après la découverte princeps de CLOETTA, l'inositol fut retrouvé également dans une urine de diabétique par NEWKOMM en 1857.

STARKENSTEIN en 1908, puis HOPPE-SEYLER en 1909, affirmèrent que cette substance existait dans les urines normales, mais seulement à l'état de traces.

Vers 1908, G. MEILLERE (dont les travaux avaient montré la répartition quasi universelle de l'inositol) et son élève P. FLEURY reprirent le problème de l'inosurie, tant physiologique que pathologique. En effet toutes les recherches antérieures n'avaient mis en évidence aucun lien certain entre l'élimination urinaire d'inositol et divers états pathologiques, pas plus qu'elles ne permettaient d'affirmer avec certitude (et encore moins de chiffrer) la réalité d'une inosurie physiologique normale.

Si les recherches sur l'inosurie n'avaient guère progressé jusqu'à cette

époque, c'est qu'elles se heurtaient à de graves difficultés techniques. La principale était de trouver et de mettre au point une méthode permettant d'isoler avec un rendement convenable l'inositol du milieu complexe que représente l'urine, et d'autre part, de doser ce corps, par nature peu réactif, avec une méthode cependant assez spécifique.

C'est ce problème technique extrêmement ardu que depuis plus de vingt-cinq ans les recherches de P. FLEURY et de ses élèves ont essayé de résoudre par divers moyens.

En 1929, P. FLEURY et J. MARQUE (19) appliquèrent sous certaines conditions à l'inositol la méthode classique à l'iodomercurate alcalin de BAUDOUIN et LEWIN, déjà utilisée pour le dosage du glucose. Mais cette méthode manquait de spécificité : en effet le réactif de NESSLER est réduit dans les mêmes conditions par les polyols linéaires comme par les cyclitols.

Par la suite, P. FLEURY et J. LANGE (18) mirent au point une méthode de dosage basée sur l'oxydation de l'inositol par l'acide periodique. Cette réaction d'oxydation est assez complexe, et son étude par P. FLEURY, G. POIROT et Mme FIEVET-GUINARD (21) a montré qu'elle s'effectuait en deux phases :

— Une première phase rapide (de l'ordre de quelques minutes) consommant 4 molécules d'acide periodique avec formation d'acide formique et d'acide glycolique.

— Une deuxième phase, plus lente (pouvant durer plusieurs jours), et s'accompagnant en outre d'un dégagement de gaz carbonique (que ne fournit pas l'oxydation periodique des polyols linéaires).

C'est alors que P. FLEURY et A. RECOULES (20), observant que le dégagement de CO^2 , mesuré par la méthode manométrique de WARBURG, était assez régulier et proportionnel à la concentration en inositol, proposèrent sur ce principe une nouvelle méthode de dosage. Cette méthode nécessitait évidemment l'élimination préalable des autres corps susceptibles de fournir par oxydation periodique un dégagement de CO^2 .

On peut en effet, selon le procédé préconisé par P. FLEURY et Mlle M. JOLY en 1937 (17), éliminer les oses par action de la magnésie à la température de 100°C ., qui les détruit en respectant intégralement les cyclitols, et en respectant aussi, il est vrai, les polyols linéaires.

Avec cette dernière méthode P. FLEURY et A. RECOULES abordèrent le problème de l'inosurie physiologique chez l'Homme. Sur une quarantaine de sujets de 20 à 40 ans, soumis à une alimentation mixte ils décélérent la présence d'inositol urinaire à des doses variant entre 90 et 200 milligrammes par litre.

La présence constante d'un corps oxydable comme un inositol dans

l'urine normale ayant été ainsi établie, il restait encore à déterminer l'identité exacte de cet inositol, car les méthodes de dosage chimique utilisées jusque-là ne permettaient pas encore de distinguer entre eux les divers isomères (méso-inositol, inositols levogyre, dextrogyre, racémique, et scyllitol). Cette distinction était pourtant d'une importance capitale, puisque, si les inositols sont assez répandus dans la nature, seul le méso-inositol jouit de propriétés physiologiques essentielles qui l'ont fait reconnaître, entre autres, comme une vitamine du groupe B, un facteur lipotropique et un facteur de croissance de divers micro-organismes (levures, certains mutants de *Neurospora crassa* ou d'*Eremothecium Ashbyii* (*Ascomycètes*), etc...).

Ce deuxième problème constitué par l'identité des inositols urinaires fut également abordé en premier lieu par P. FLEURY et A. RECOULES avec des méthodes chimiques. En opérant sur une dizaine de litres d'urines, fractionnées à la suite de traitements très complexes, ils ne purent séparer de méso-inositol, mais aboutirent en 1948 à l'isolement d'un de ses isomères, le scyllitol, dont la présence dans l'urine humaine était ainsi signalée pour la première fois (P. FLEURY, 10).

Le problème de l'identification exacte des inositols urinaires est heureusement devenu plus abordable à la suite des travaux récents de P. FLEURY, J.-E. COURTOIS et P. MALANGEAU (16), qui ont montré la possibilité de séparer le méso-inositol du scyllitol en utilisant la chromatographie sur papier en présence du méthanol, et de caractériser ensuite ces deux corps par la réaction colorée de SCHERER-GALLOIS.

P. FLEURY, J.-E. COURTOIS, P. MALANGEAU et A.-L. JOUANNET (15, 34, 26) ont ainsi caractérisé le méso-inositol et le scyllitol dans diverses urines de mammifères.

Evidemment, ces recherches n'ont pu être effectuées que sur des extraits urinaires suffisamment purifiés. C'est ainsi que P. MALANGEAU (32) a été amené à étudier et à proposer une technique élégante et relativement simple de purification des urines, utilisant les résines échangeuses d'ions. Cette technique a paru beaucoup plus commode que les méthodes chimiques de défécation, laborieuses et de rendement souvent insuffisant. C'est donc vers elle que nous nous sommes tournés quand nous avons décidé d'aborder nous-mêmes, sur les conseils de notre Maître, le Professeur J.-E. COURTOIS, le problème de l'inosurie physiologique.

Toutefois, comme les techniques précitées ne visaient qu'une recherche qualitative des inositols, et que nous nous proposons de doser également le méso-inositol, il nous a paru nécessaire d'étudier d'abord, et de modifier ensuite, la technique primitive d'extraction par les résines échangeuses d'ions, afin d'assurer une extraction quantitative du méso-inositol, se prêtant au dosage ultérieur.

Comme d'autre part la caractérisation chromatographique des inositols

ne pouvait fournir au mieux qu'une évaluation approximative des quantités de méso-inositol contenues dans l'urine, nous avons fait appel pour leur dosage proprement dit à une méthode microbiologique.

Nous avons choisi comme test le mutant « inositolless » de *Neurospora crassa* (*Ascomycètes*) décrit par G.-W. BEADLE (1) et qui constitue actuellement, selon W.-H. SCHOPFER (49) l'un des réactifs les plus spécifiques du méso-inositol. Cette opinion est également partagée par C.-C. LUCAS (30) qui préfère, malgré sa longueur d'exécution, le test au *Neurospora* à la méthode de D.-W. WOOLLEY (53) utilisant la souche de levure *Toronto* de *Saccharomyces cerevisiae*, et qui fut la première méthode utilisée pour le dosage microbiologique du méso-inositol.

Compte tenu de ces observations, notre programme de travail s'est ainsi trouvé fixé : il a comporté trois parties principales distinctes, que nous respecterons dans le plan de notre exposé.

Dans une première partie nous avons étudié les méthodes de dosage de l'inositol auxquelles nous avons eu recours.

Puis, dans une deuxième partie, nous nous sommes préoccupés d'obtenir des extraits urinaires purifiés, renfermant la totalité des inositols.

Enfin, dans une troisième partie, nous avons pu aborder le problème de l'inosurie physiologique.

Pour l'ensemble de ces recherches, il nous est apparu que, plutôt que de multiplier des essais peu précis, il était préférable de procéder à un nombre plus limité de déterminations, mais avec des méthodes sûres. C'est pourquoi nous avons toujours associé à l'appréciation chromatographique de l'inositol le dosage microbiologique au *Neurospora*, d'une réalisation beaucoup plus longue, mais par contre plus précis. Les deux méthodes se sont d'ailleurs confirmées mutuellement, puisqu'elles ont conduit à des chiffres de même ordre de grandeur.

Avant d'exposer nos résultats, nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance à notre Maître, M. le Professeur J.-E. COURTOIS, qui a bien voulu nous confier ce travail, et nous a constamment suivi dans notre tâche en nous prodiguant ses conseils éclairés. Nous le prions de bien vouloir trouver ici l'expression de notre fidèle attachement.

Nous remercions également M. le Professeur P. FLEURY, qui nous a toujours suivi avec un intérêt bienveillant et qui nous a le premier accueilli dans son Laboratoire. Nous avons toujours trouvé auprès de lui le meilleur accueil, et il s'est d'autant plus intéressé à nos travaux qu'il connaissait les difficultés du problème de l'inosurie pour les avoir longuement éprouvés lui-

même au cours de sa carrière. Nous sommes heureux de pouvoir lui exprimer ici notre respectueuse gratitude.

Nos plus sincères remerciements vont également à M. le Professeur P. MALANCEAU, qui nous a prodigué de précieux conseils et nous a fait bénéficier de son expérience tant pour l'utilisation des résines échangeuses d'ions que pour la pratique de la chromatographie sur papier, et à M. R. PERLÈS, Assistant de la chaire de Chimie Biologique, qui nous a initié à la pratique délicate du test au Neurospora.

NOTE PRÉLIMINAIRE

On sait que les inositols ou cyclohexane-hexols, qui répondent à la formule générale $(\text{CHOH})_6$, existent sous plusieurs formes isomères.

Dans l'ensemble de notre travail, afin d'alléger le texte, le terme « inositols » employé au pluriel désignera soit les cyclohexane-hexols en général, soit plusieurs d'entre eux.

Le terme « inositol » au singulier désignera l'un de ces isomères, clairement indiqué par le contexte; il s'agira le plus souvent du méso-inositol qui constitue l'essentiel de notre étude et qui semble l'isomère le plus important du point de vue biologique.

Enfin, chaque fois que cela nous a paru utile, nous avons employé la désignation exacte, propre à chaque isomère : « méso-inositol » ou « scyllitol » par exemple.

De même le terme « inosose », employé au pluriel ou au singulier, désignera respectivement un dérivé ou l'ensemble des dérivés d'oxydation des inositols répondant à la formule générale : $(\text{CHOH})_5 = \text{CO}$. Nous préciserons, si nécessaire, de quel isomère il s'agit : « scyllo-méso-inosose » ou « épi-méso-inosose ».

Il nous a paru utile également de rassembler ici les schémas indiquant la configuration spatiale des principaux inositols et inososes, qui seront mentionnés ultérieurement dans notre travail (*figure 1*). Les atomes de carbone ont été numérotés dans le sens des aiguilles d'une montre, et seulement, dans la première formule, pour ne pas surcharger les schémas. Les traits verticaux représentent la position des groupes —OH par rapport au plan du cycle, position qui peut s'exprimer également par une sorte de fraction, suivant la notation de LESPIEAU et de MAQUENNE.

FIGURE 1

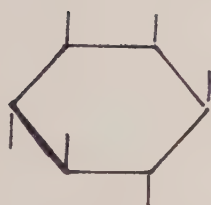
CONFIGURATION DES PRINCIPAUX CYCLOHEXANE-HEXOLS ET
DE LEURS DERIVES D'OXYDATION

(d'après H. G. FLETCHER, L. ANDERSON & A. L. HARDY (9))



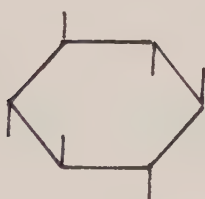
INOSITOLS ou CYCLOHEXANE-HEXOLS

Formule générale



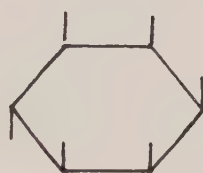
$\frac{1 \ 2 \ 3 \ 5}{4 \ 6}$

méso-inositol



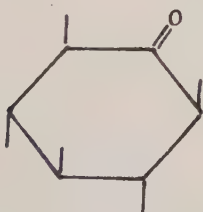
$\frac{1 \ 3 \ 5}{2 \ 4 \ 6}$

scyllitol

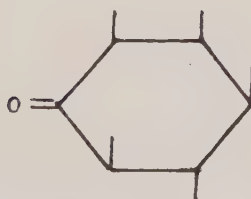


$\frac{1 \ 2 \ 3 \ 4 \ 5}{6}$

épi-inositol



scyllo-méso-inosose
(inosose biochimique)



épi-méso-inosose
(inosose chimique)

Echantillons utilisés

Pour l'ensemble de nos recherches nous avons utilisé divers échantillons de cyclitols :

Echantillon n° 1 : méso-inositol « pur », des Laboratoires ALLARD (*), sans autre indication de provenance.

Echantillon n° 2 : méso-inositol pur « de maïs » ALLARD (*).

Echantillon n° 3 : méso-inositol pur « de riz » ALLARD (*).

Echantillon n° 4 : scyllitol pur, obtenu par M. P. MALANGEAU (32) [selon la méthode qu'il a décrite dans sa thèse], par réduction du scyllo-méso-inosose lui-même préparé, en oxydant biochimiquement le méso-inositol par action de l'*Acetobacter suboxydans*.

Ces divers échantillons ont été d'abord rigoureusement essayés quant à leurs caractères d'identité et de pureté, et ont satisfait à tous les essais, en particulier ils se sont montré parfaitement anhydres.

Les diverses déterminations effectuées comparativement sur nos trois échantillons de méso-inositol (dosage par l'acide periodique, évaluation chromatographique et test au *Neurospora*) ont fourni des résultats semblables et satisfaisants.

Enfin l'analyse chromatographique a montré que nos échantillons de méso-inositol, étaient rigoureusement exempts de scyllitol, détail qui revêtait la plus haute importance pour la suite de nos recherches biologiques.

(*) Nous remercions vivement les Laboratoires ALLARD, 4, rue Treillard, à Paris, qui ont mis aimablement à notre disposition, en quantités suffisantes les échantillons divers de méso-inositol pur utilisés pour nos travaux.

PREMIÈRE PARTIE

DOSAGE DE L'INOSITOL EN SOLUTION PURE

CHAPITRE PREMIER

DOSAGE VOLUMÉTRIQUE DES INOSITOLS PAR L'ACIDE PERIODIQUE

Cette méthode a été proposée pour la première fois par P. FLEURY et Mlle M. JOLY (17). Elle est à la fois simple et précise, et donne d'excellents résultats si l'on observe bien certaines conditions opératoires. Nous l'avons choisie comme méthode de référence pour tous nos essais portant sur des solutions aqueuses d'inositol pur, sans addition d'autres composés.

PRINCIPE

Le principe de cette méthode consiste à oxyder la quantité d'inositol à doser par un excès de solution titrée d'acide periodique, dans des conditions déterminées. Après un certain temps de contact, on mesure cet excès d'acide periodique par double retour. A cet effet on ajoute un excès de solution titrée d'anhydride arsénieux, qui réduit l'acide periodique restant, puis on détermine cet excès d' AS_2O_3 , non oxydé par une solution titrée d'iode.

Selon les conditions opératoires, l'oxydation périodique d'une molécule d'inositol nécessiterait environ de 6 atomes d'oxygène (J. LANGE, 29) à 6,8 atomes d'oxygène (Mlle M. JOLY, 25).

Mme Y. FIEVET GUINARD (8) a en effet montré que cette oxydation periodique de l'inositol est assez lente, et que si à son terme la consommation d'oxygène est voisine de 6,7 atomes, ce terme n'est atteint qu'après un temps de contact parfois très long et variable avec la température. C'est ainsi que cette réaction est complète après 30 jours à la température de $0^{\circ}C.$, après 2 à 3 jours à 37° , et qu'elle ne demande que 6 heures à $50^{\circ}C.$

Dans la pratique, il n'est pas nécessaire d'attendre le terme de cette oxydation pour effectuer le dosage volumétrique de l'inositol par cette technique, sous la seule condition d'opérer comparativement avec un témoin en quantité connue d'inositol pur, titré. On abrège ainsi la longueur de l'opération sans nuire aucunement à sa précision.

MODE OPÉRATOIRE

Pour nos dosages nous nous sommes inspirés du protocole adopté par A. RECOULES (48) et nous avons opéré comme suit :

Réactifs et solutions titrées

— Solution décimoléculaire d'acide periodique préparée de la façon suivante, par action de l'acide sulfurique sur le periodate de sodium pur (Prolabo (R. P.) de formule $\text{IO}_6 \text{H}_2 \text{Na}_3$ (P.M. = 293,9) :

Dans une fiole jaugée de 500 ml. agiter 14,70 g. de périodate de sodium pur, avec 150 ml. d'acide sulfurique en solution normale, jusqu'à dissolution totale, et compléter à 500 ml. avec de l'eau distillée. Cette solution est d'excellente conservation et n'a pas besoin d'être ajustée exactement.

— Solution décinormale d'anhydride arsénieux bicarbonaté (As_2O_3 N/10).

— Solution étalon de méso-inositol à 0,90 g. par litre exactement, soit M/200 (P.M. inositol à 180,2 g.) : 10 ml. de cette solution correspondant exactement à 9mg. de méso-inositol.

— Solution aqueuse de bicarbonate de potassium à 20 g. pour 100 ml.

— Solution aqueuse d'iodure de potassium à 20 g. pour 100 ml.

— Solution d'iode décinormal (I N/10).

Dosage

Pour chaque dosage (ou série de dosages), nous disposons ainsi dans quatre Erlenmeyer (ou davantage) 10 ml. exactement de solution d'acide periodique M/10.

Puis chaque fiole reçoit :

— Fiole n° 1 (témoin « à blanc » de l'acide periodique) :

Eau distillée 15 ml.

— Fiole n° 2 (témoin inositol à 9 mg.) :

Solution d'inositol M/200 10 ml. exactement.

— Fiole n° 3 (témoin inositol à 18 mg.) :

Solution d'inositol M/200 20 ml. exactement.

— Fiole n° 4 et suivantes éventuellement (essai proprement dit) :

Solution d'inositol à doser Q. S. exactement mesurée.

Cette prise d'essai doit être de l'ordre de 10 ml. et contenir de 0 à 18 mg. d'inositol pour que le dosage s'effectue correctement. En effet, dans les conditions opératoires choisies, la quantité d'acide periodique M/10 utilisée (10 ml.) suffit à oxyder environ 20 mg. d'inositol, et il convient que l'acide periodique soit au moins en léger excès.

Les fioles sont ensuite portées 12 heures à l'étuve à 37° C., ou plus simplement laissées 24 heures à la température du laboratoire. Après ce délai on ajoute dans chaque fiole :

— Solution de bicarbonate de potassium à 20 %, 10 ml.

— Solution d'anhydride arsénieux N/10..... 20 ml. exactement.

— Solution d'iodure de potassium à 20 %..... 0,5 ml.

On abandonne à la température du laboratoire pendant 15 minutes, la présence d'iodure de potassium catalysant la réaction de l'anhydride arsénieux sur l'acide periodique en excès.

Cet excès est alors déterminé dans chaque fiole en versant la solution d'iode N/10 jusqu'à teinte jaune pâle, ou mieux jusqu'à virage de quelques gouttes d'empois d'amidon ajouté vers la fin du dosage.

On obtient ainsi pour chaque fiole un volume différent d'iode N/10 consommé, soit :

Fiole n° 1 = x_1 ml. (témoin à « blanc » de l'acide periodique).

Fiole n° 2 = x_2 ml. (témoin à 9 mg. d'inositol).

Fiole n° 3 = x_3 ml. (témoin à 18 mg. d'inositol).

Fiole n° 4 = x_1 ml., etc... (essais).

Les différentes $x_2 - x_1$ et $x_3 - x_1$ représentent les quantités d'iode (et donc l'acide periodique) correspondant respectivement à 9 et 18 mg. d'inositol.

Pour chaque essai, les différences x_i (et suivantes), x_1 représentent proportionnellement les quantités d'iode (et donc d'acide periodique) correspondant à la quantité d'inositol contenue dans la prise d'essai de la (ou des) solution (s) à doser.

Une simple règle de 3 permet alors de calculer aisément cette quantité en la rapportant à l'un ou l'autre des témoins de 9 ou 18 mg. d'inositol.

REMARQUES PERSONNELLES

Dans son mode opératoire A. RECOULES (48) utilise seulement 15 ml. de solution décimale d'anhydride arsénieux, dans des conditions analogues. Nous avons observé plusieurs fois dans ces conditions une libération d'iode (au moins dans la fiole n° 1) témoignant d'un excès d'acide périodique par rapport à la quantité d'anhydride arsénieux introduite.

Pour éviter cette libération d'iode gênante, il nous a paru nécessaire, et toujours suffisant, de porter à 20 ml. la quantité d'AS₂O₃ N/10 à ajouter dans chaque fiole. La Pharmacopée Française, dans sa dernière édition (41-42), indique d'ailleurs, pour sa technique de dosage de l'inositol, d'utiliser 25 ml. de solution N/10 d'anhydride arsénieux.

De même le mode opératoire usuel préconise l'emploi d'un seul témoin à 9 mg. d'inositol (A. RECOULES, 48), ou à 18 mg. (CODEX, 41) Personnellement nous avons préféré utiliser concurremment ces deux témoins pour chaque série d'essais. De la sorte, on n'ajoute qu'une seule fiole supplémentaire (ce qui ne complique guère les opérations) et, les deux témoins se contrôlant mutuellement, on augmente la sécurité et la précision du dosage.

Enfin nous avons pratiqué deux séries d'essais parallèles préliminaires en réalisant l'oxydation respectivement à l'étuve à 37° C. et d'autre part pendant 24 heures à la température du laboratoire (soit environ 15 à 20° C.). Comme en fait nous avons obtenu des résultats identiques dans les deux conditions, nous avons conclu à l'inutilité de l'étuve, et effectué tous nos dosages ultérieurs avec 24 heures d'oxydation périodique à la température du laboratoire. Cette façon de faire présentait entre autres avantages, celui de ne pas encombrer une étuve déjà largement utilisée pour d'autres opérations, comme nous le verrons plus loin.

L'oxydation périodique de l'inositol ne s'appliquant qu'au dosage de solutions pures, comme nous le disions plus haut, nous avons été amenés à choisir pour nos dosages d'extraits urinaires une technique microbiologique spécifique, en l'occurrence le test au *Neurospora crassa*.

CHAPITRE II

DOSAGE MICROBIOLOGIQUE DU MESO-INOSITOL PAR LE TEST AU *NEUROSPORA CRASSA*

En 1944, G.-W. BEADLE (1) a décrit un mutant artificiel de *Neurospora crassa* (Ascomycètes) qu'il a obtenu en irradiant à la lumière ultra-violette une souche sauvage provenant d'ascospores. Ce mutant a reçu le nom de « inositolless » parce que le méso-inositol agit sur lui quantitativement comme un facteur de croissance essentiel, que ce micro organisme ne saurait plus synthétiser.

Cette souche constitue ainsi, selon W.-H. SCHOPFER (49), qui en a préconisé l'emploi, un réactif très spécifique du méso-inositol à l'exclusion de ses isomères et en particulier du scyllitol. C'est elle que nous avons utilisée pour tous nos essais microbiologiques (*), en suivant la méthode décrite par W.-H. SCHOPFER, Th. POSTERNAK et Mlle M.-L. BOSS (51). Nous en reproduisons ci-dessous les détails techniques, en tenant compte des indications fournies par A.-L. JOUANNET (26).

TECHNIQUE DU TEST AU *NEUROSPORA*

a) MILIEUX DE CULTURE ET TECHNIQUE DE PRÉPARATION

Nous distinguerons le milieu de conservation des souches du milieu de culture liquide utilisé pour les essais quantitatifs.

1° Milieu de conservation de la souche (milieu moût-agar)

Formule :

Agar	20 g.
PO ₄ KH ₂	2,50 g.
SO ₄ Mg, 7OH ₂	0,50 g.
ClNa	0,10 g.
Asparagine	0,10 g.
Glucose	5 gr.
Méso-inositol	40 mg.
Eau distillée Q.S.P.	1.000 ml.

(*) Les souches de « *Neurospora crassa* » inositolless utilisées pour nos essais, nous ont été fournies obligeamment et renouvelées régulièrement pendant plusieurs années, par le Professeur W.-H. SCHOPFER. Nous lui exprimons nos respectueux remerciements.

Préparation :

Dans un ballon de 1 litre, on délaie les 20 g. d'agar, en paillettes finement coupées, avec 500 ml. d'eau distillée. Pour obtenir une dissolution aussi complète que possible on bouche le ballon au coton cardé et on le place dans un autoclave; on porte à la température de 110°C. pendant 15 minutes. On filtre à chaud sur gaze dans un ballon de 1.500 ml. On dissout ensuite les autres produits dans 200 à 300 ml. d'eau distillée chaude, et on ajoute cette solution à la première.

D'un autre côté, on stérilise à l'autoclave (à 110°-115° C.) 150 à 200 ml. de moût de bière (*). Il se produit un précipité. Après refroidissement, on laisse décanter. On recueille 110 ml. de liquide clair que l'on ajoute au ballon contenant déjà en solution l'agar et les autres produits. Enfin on ajoute 40 mg. de méso-inositol dissout dans un peu d'eau, et on complète à 1.000 ml. avec de l'eau distillée.

Le liquide chaud est réparti dans des tubes à essai à raison de 15 à 20 ml. par tube. Ceux-ci sont bouchés au coton cardé, puis stérilisés 15 minutes à l'autoclave à 115° C. deux fois à 24 heures d'intervalle.

A la sortie de la deuxième stérilisation ces tubes sont inclinés, et on les laisse refroidir. Après solidification ils sont munis d'un capuchon de caoutchouc et conservés dans un endroit frais pour éviter la dessiccation.

Il faut prévoir un nombre de tubes permettant un repiquage tous les 15 jours environ pendant un certain temps.

Entretien des souches :

Chaque repiquage se fait sur deux ou trois tubes chaque fois, car il peut se trouver que des cultures soient envahies de moisissures étrangères, et de ce fait rendues inutilisables.

Il ne faut pas non plus préparer un trop grand nombre de tubes, car après 2 à 3 mois au maximum les milieux peuvent être trop desséchés pour permettre le développement normal du *Neurospora*.

L'ensemencement se fait en laissant tomber sur la surface du milieu quelques spores prélevés aseptiquement, à l'aide d'une anse de platine flambée sur la culture précédente. Ces opérations doivent être pratiquées au-dessus d'une flamme de bec Bunsen, pour éviter les souillures des milieux par des spores étrangères apportées avec l'air ambiant.

La culture se fait à l'étuve, à une température comprise entre 25 et 29° C.

(*) Le moût de bière nous a été fourni par les Brasseries PAILLETTE, Le Havre (Seine-Maritime).

2° Milieu de culture pour les essais d'inositol (milieu liquide)

Formule :

Glucose	15 g.
Tartrate neutre d'ammonium.....	5 g.
Nitrate d'ammonium	1 g.
PO ₄ KH ₂	2,50 g.
SO ₄ Mg, 7 OH ₂	0,50 g.
ClNa	0,10 g.
Cl ₂ Ca, 6 OH ₂	0,10 g.
Cl ₃ Fe	5 mg.
SO ₄ Zn, 7 OH ₂	2 mg.
d-l-Biotine	2 mg.
Eau distillée Q.S.P.	1.000 ml.

Préparation :

On dissout dans 500 à 600 ml. d'eau distillée les corps suivants : glucose, nitrate d'ammonium, phosphate monopotassique, sulfate de magnésium et chlorure de sodium. On filtre si le liquide n'est pas très limpide.

D'autre part on dissout séparément dans un peu d'eau chacun : le chlorure de calcium, le perchlorure de fer (*), le sulfate de zinc (**) et la biotine (***). On les ajoute successivement à la première solution. On stérilise alors le liquide obtenu pendant 15 minutes à 115° C. et on répartit dans des Erlenmeyer de 100 ml. de capacité environ, à raison de 25 ml. de milieu par fiole. Stériliser 15 minutes à 115° C.

Enfin, on préparera une solution aqueuse de tartrate d'ammonium à 25 g. pour 100 ml., qui sera stérilisée à part. On ajoutera à l'aide d'une pipette stérile cette solution au milieu de culture, à raison de 0,4 ml. par flacon, au moment de l'ensemencement.

D'autre part, les cyclitols à essayer seront dissouts à part, et les solutions stérilisées pendant 15 minutes à 115° C.

b) DOSAGE

La culture du *Neurospora* sur moût-agar peut être employée dès qu'elle a recouvert toute la surface du milieu et qu'elle offre l'aspect d'une couche pulvérulente rose. On en prélève une petite quantité à l'extrémité d'un fil de platine formant une boucle de 1 à 2 mm. de diamètre, que l'on délaie dans 15 ml. d'eau distillée stérile. On agite suffisamment pour obtenir une suspension bien homogène avant de la répartir dans les Erlenmeyer.

(*) Pour le FeCl₃, on emploie 0,05 ml. d'une solution à 10 pour 100. La solution que l'on trouve communément est de D = 1,26 et contient 26 p. 100 de Fe Cl₃ pur. On en prend 10 ml. auxquels on ajoute 16 ml. d'eau distillée, ce qui donne une solution à 10 p. 100.

(**) Pour le SO₄Zn, on prendra 0,10 ml. d'une solution à 2 p. 100.

(***) Pour la Biotine, on en pèse 1 mg. que l'on dissout dans 10 ml. d'eau distillée (solution à 1 p. 10.000). Un ml. de cette solution, soit 0,1 mg., est amené à 100 ml. avec de l'eau distillée. La solution finale contient donc 1 µg. pour 1 ml. Nous en prendrons 2 ml. pour 1.000 ml. de milieu liquide.

Chaque ensemencement se fera en deux ou trois exemplaires, car il arrive souvent que les flacons soient envahis par les éléments mycéliens étrangers, et ne peuvent servir à l'expérience.

On disposera l'expérience comme il est indiqué dans le tableau 1.

TABLEAU 1

DISPOSITION DU TEST AU « NEUROSPORA CRASSA »
(d'après A.-L. JOUANNET, 26)

TÉMOINS	Flacons n° contenant :	1	2	3	4	5	6
	Milieu liquide de culture	25 ml.	25	25	25	25	25 ml.
	Sol. stérile tartatre NH ⁴	0,4 ml.	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4 ml.
	Méso-inositol (stérile)	0 µg.	50	75	100	200	1.000 µg.
	Suspension spores <i>Neurospora</i>	1 ml.	1	1	1	1	1 ml.
DOSAGE	Flacons n°	1'	2'	3'	4'	5'	6'
	Mêmes réactifs que ci-dessus sauf inositol remplacé par :	—	—	—	—	—	—
	Corps à étudier	0 µg.	50	75	100	200	1.000 µg.

(ou quantités d'extraits
correspondants contenant ces doses)

A première vue on peut déjà se rendre compte de l'importance des variations dans le développement des cultures, en particulier on peut noter si les différentes doses du corps essayé produisent un effet comparable au méso-inositol, ou si ces doses n'ont pas donné plus de développement qu'on en obtient dans le flacon témoin n° 1, sans addition de cyclitol.

Pour une appréciation plus exacte, on recueille les thalles sur un filtre taré, placé sur un petit entonnoir de Büchner relié à une trompe à vide. On élimine le liquide nutritif et on rince à plusieurs reprises à l'eau distillée. On enlève le filtre sur lequel s'est appliquée la pellicule de thalle, et on dessèche à l'étuve à 100° C. jusqu'à un poids constant. Il faut environ 1 à 2 heures d'étuve.

On laisse refroidir dans un dessiccateur, et on pèse. On déduit le poids du filtre. On peut aussi, si l'on veut opérer exactement selon le protocole suivi par Mlle M.-L. BOSS détacher le thalle du papier filtre et en faire une boulette que l'on sèche et pèse.

Sur un même graphique on trace la courbe correspondant au produit à essayer, et la courbe correspondant au méso-inositol ou on peut également dresser un tableau des résultats obtenus de part et d'autre.

ETUDE PERSONNELLE DU TEST AU *NEUROSPORA CRASSA*

La pratique du test au *Neurospora*, telle qu'elle est décrite ci-dessus, apparaît assez complexe et délicate. Elle requiert beaucoup de soins, et même en s'entourant du maximum de précautions il arrive parfois que l'on obtienne des courbes de croissance défectueuses.

C'est pourquoi dès le début de nos recherches il nous a paru nécessaire d'étudier, et d'essayer de définir, les conditions optimum pour l'exécution de ce test, ainsi que ses facteurs éventuels de perturbation.

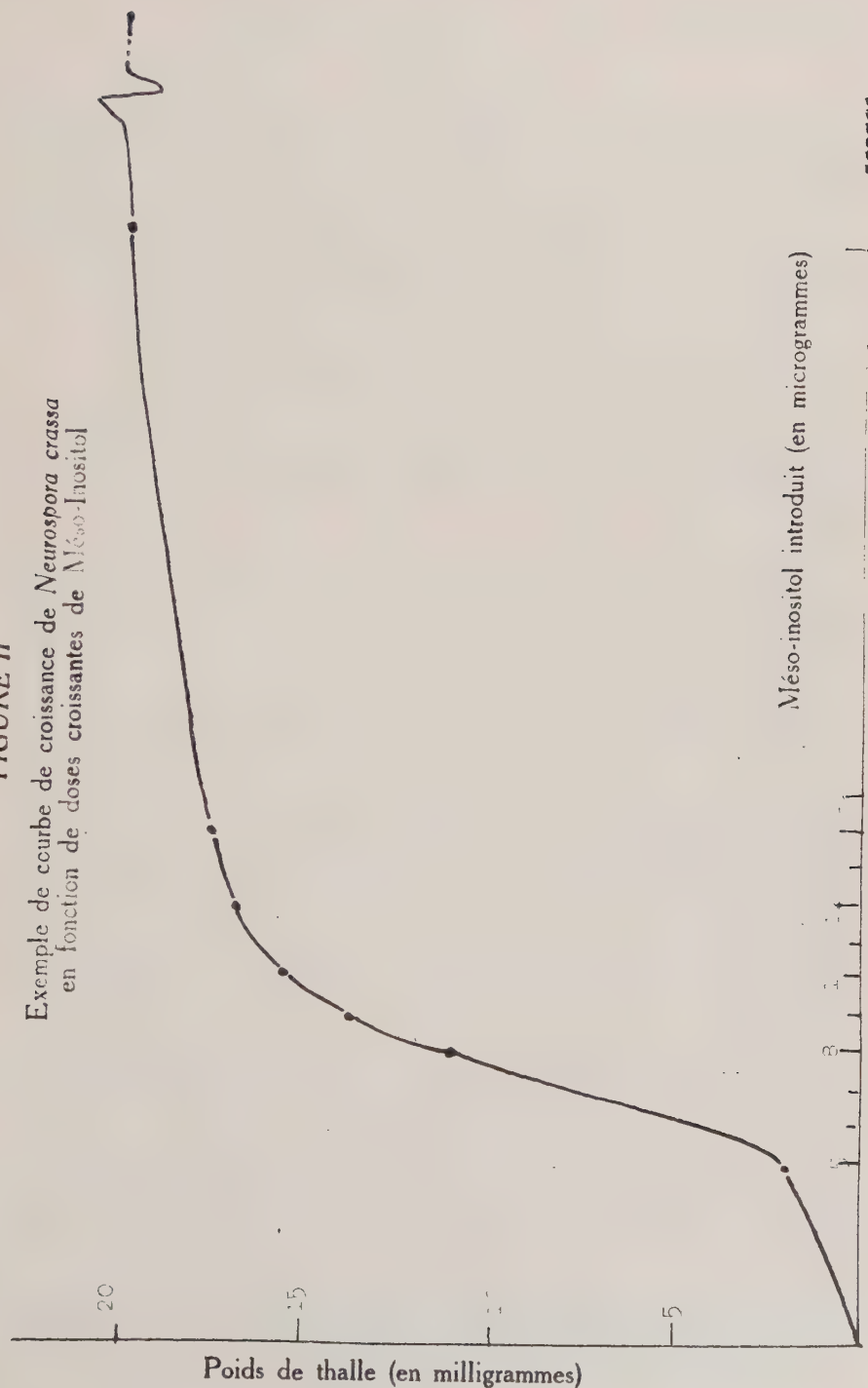
a) ETUDE DES COURBES DE CROISSANCES NORMALES

Il convient d'abord de préciser comment le *Neurospora* « inositolles » réagit normalement en présence de doses croissantes de méso-inositol. A cet effet nous reproduisons ci-dessous l'une des courbes de croissance obtenues au cours de nos essais, et qui peut être considérée comme une « courbe type » (figure 11).

On remarquera qu'en l'absence de méso-inositol le développement du *Neurospora* est nul. En effet, dans la majeure partie de nos essais nous

FIGURE II

Exemple de courbe de croissance de *Neurospora crassa*
en fonction de doses croissantes de Méso-Inositol



avons trouvé, en l'absence de méso-inositol, des poids de thalle nuls ou inférieurs à 1 mg., ainsi qu'il apparaît dans le graphique ci-dessous (*figure III*).

Dans les mêmes conditions nous avons trouvé parfois des poids de thalle supérieurs (variant de 3 à 11 mg.), mais alors ils s'intégraient souvent dans des courbes d'allures irrégulières pouvant faire supposer une contamination du milieu par un germe autre que le *Neurospora*.

A notre avis, il y a donc lieu de considérer comme suspect en l'absence du méso-inositol, tout développement de *Neurospora* dépassant 1 mg. dans les conditions expérimentales qui ont été définies.

L'examen d'une courbe normale de développement du *Neurospora*, en fonction de doses croissantes de méso-inositol, montre que celle-ci se divise en trois parties. Sur notre courbe type (*figure II*) on observe en effet :

— Une première partie : de 0 à 5 μ g. de méso-inositol : la croissance du *Neurospora* y est presque nulle. Plusieurs essais nous ont d'ailleurs montré que des doses d'inositol inférieures à 3 μ g. n'étaient guère décelables par cette méthode.

— Une deuxième partie : de 5 à 15 μ g. de méso-inositol : la croissance du *Neurospora* y augmente rapidement et proportionnellement. Cette portion de la courbe affecte presque la forme d'une droite, le plus souvent.

— Une troisième partie : au-delà de 15 à 20 μ g. de méso-inositol (limite plus difficile à préciser) : la courbe s'infléchit progressivement vers l'horizontale, témoignant d'une croissance maximum du *Neurospora* qui n'est plus guère influencée par des doses très supérieures de méso-inositol (de l'ordre de 30 à 100 μ g.) constituant des doses supra-optimales.

La courbe-type de nos essais que nous avons reproduite, est d'ailleurs assez semblable à celle déjà publiée par Th. POSTERNAK et W.-H. SCHOPFER (46, 47).

On remarquera que seule la partie médiane de cette courbe qui traduit des variations notables et régulières du développement du *Neurospora*, en fonction de doses croissantes de méso-inositol, est utilisable pour un dosage microbiologique de cette substance.

Afin de rendre le test au *Neurospora* pratique et sûr, nous avons cherché à définir au cours d'une série d'essais préliminaires, quelles étaient les doses croissantes de méso-inositol à utiliser pour la constitution de la gamme de référence, et ce avec un nombre volontairement limité de flacons.

Nous résumons commodément dans le graphique suivant (*figure IV*) les résultats de notre étude statistique effectuée dans ce sens et portant sur 16 courbes différentes de croissance du *Neurospora*. Ce graphique ex-

FIGURE III

DEVELOPPEMENT DU *NEUROSPORA CRASSA* « inositolless »
en l'absence de MESO-INOSITOL
(Etude statistique sur 30 courbes de croissance)

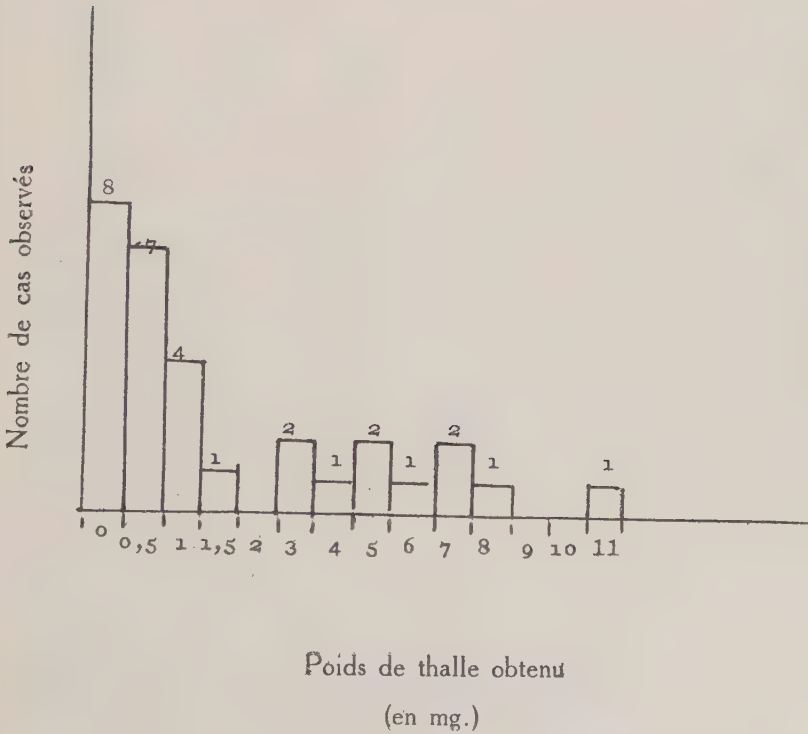
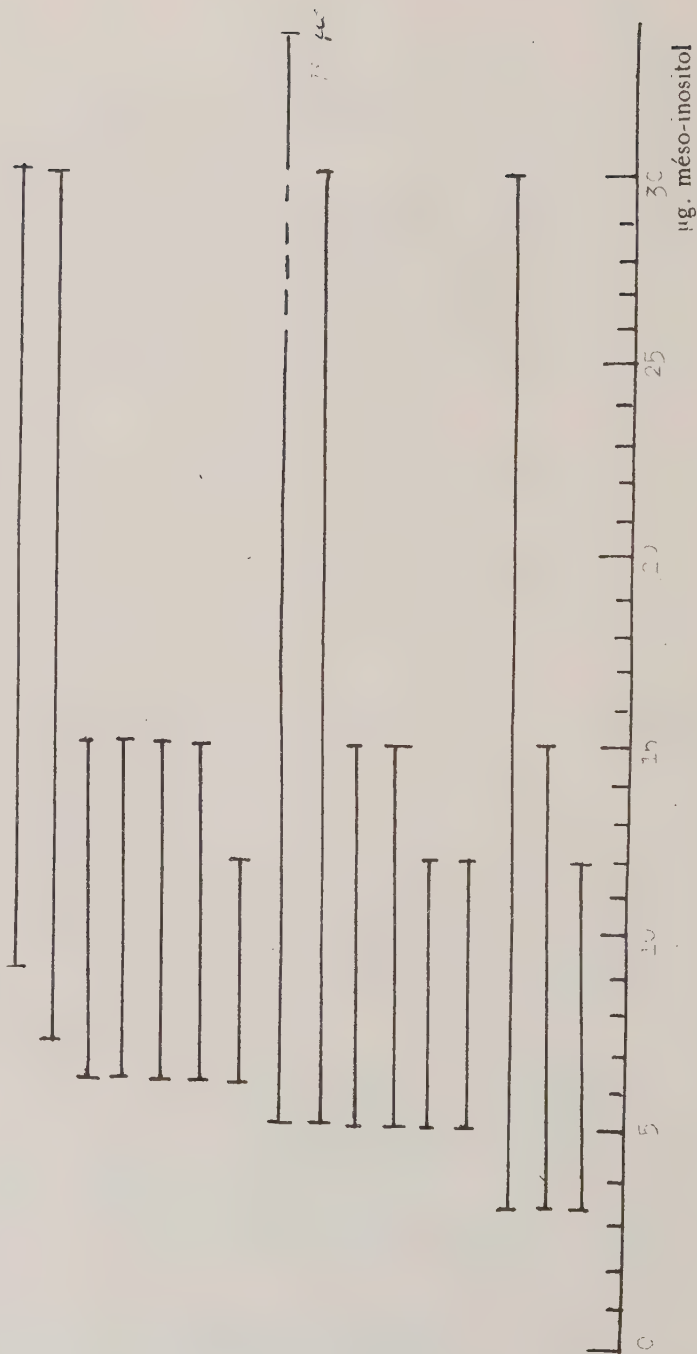


FIGURE IV

TESTS AU NEUROSPORA — LIMITES DES « ZONES
UTILISABLES » POUR LE DOSAGE MICROBIOLOGIQUE

(en fonction des doses de méso-inositol introduites)

(ÉTUDE DE 16 COURBES DE CROISSANCE DIFFÉRENTES)



Limites de la zone médiane pour chaque essai :

prime pour chaque courbe, en fonction des doses de méso-inositol introduites, les limites de la zone médiane utilisable pour un dosage correct du méso-inositol.

Il apparaît clairement que les premières quantités dosables de méso-inositol varient de 3 à 6 μg . dans presque tous les cas (moyenne 5 μg . environ). C'est ce que traduit le « virage » assez brusque de la partie médiane ascendante de la courbe-type.

La limite supérieure (beaucoup plus difficile à définir) de la partie médiane utilisable se situe, selon les essais divers, de 13 à 30 μg ., et le plus souvent aux environs de 15 à 20 μg . de méso-inositol. C'est ce que traduit le retour progressif à l'horizontale de la courbe-type.

A la suite de ces observations, nous avons fixé les doses de méso-inositol qui nous ont paru les plus rationnelles pour la constitution d'une gamme de référence utilisant seulement 8 flacons.

Nous avons utilisé au cours de nos essais la gamme ci-dessous :

GAMME-TÉMOIN N° 1

Flacon n°	1	2	3	4	5	6	7	8
Méso-inositol	0 μg .	5	10	15	20	25	30	100 μg .

ou mieux encore la progression suivante :

GAMME-TÉMOIN N° 2

Flacon n°	1	2	3	4	5	6	7	8
Méso-inositol	0 μg .	5	8	10	12	15	30	100 μg .

Cette disposition permet de saisir assez bien les « virages » de la courbe de croissance, et nous l'avons toujours préférée à celle indiquée par A.-L. JOUANNET (26), et reproduite ici, qui utilise seulement 6 flacons avec des doses bien supérieures :

GAMME-TÉMOIN de A.-L. JOUANNET

Flacon n°	1	2	3	4	5	6
Méso-inositol	0 μg .	50	75	100	200	1.000 μg .

En effet, avec ces doses importantes de méso-inositol, le maximum de développement du *Neurospora* est atteint dès le 2^e ou 3^e flacon, et la courbe obtenue n'a plus aucune précision. Cette disposition qui est seulement acceptable pour une recherche qualitative, ou tout au plus pour une évaluation grossière du méso-inositol, ne peut se prêter au dosage microbiologique.

b) RECHERCHE DES CAUSES DE PERTURBATIONS OBSERVÉES

La courbe-type de croissance normale du *Neurospora* ayant été ainsi définie, en fonction des doses optimum de méso-inositol, nous avons cherché à savoir pourquoi, dans certains cas et dans des conditions expérimentales apparemment identiques, la croissance était perturbée et ne correspondait plus aux doses de méso-inositol introduites.

Nous avons distingué deux sortes de facteurs de perturbations : 1^o des facteurs extrinsèques, dépendant des conditions opératoires ; 2^o des facteurs intrinsèques, dépendant du *Neurospora* lui-même.

Température :

Nous avons tout d'abord étudié l'influence de la température. W.-H. SCHOPFER et ses collaborateurs (51) conseillent de pratiquer le test au *Neurospora* en étuve, à l'obscurité, en maintenant pendant trois jours la température à 29° C. A.-L. JOUANNET (26) effectue ses cultures entre 24 et 29° C. pendant trois à quatre jours. Nous-mêmes avons effectué tous nos tests en maintenant les cultures trois ou quatre jours dans une étuve obscure, entre 26 et 30° C.

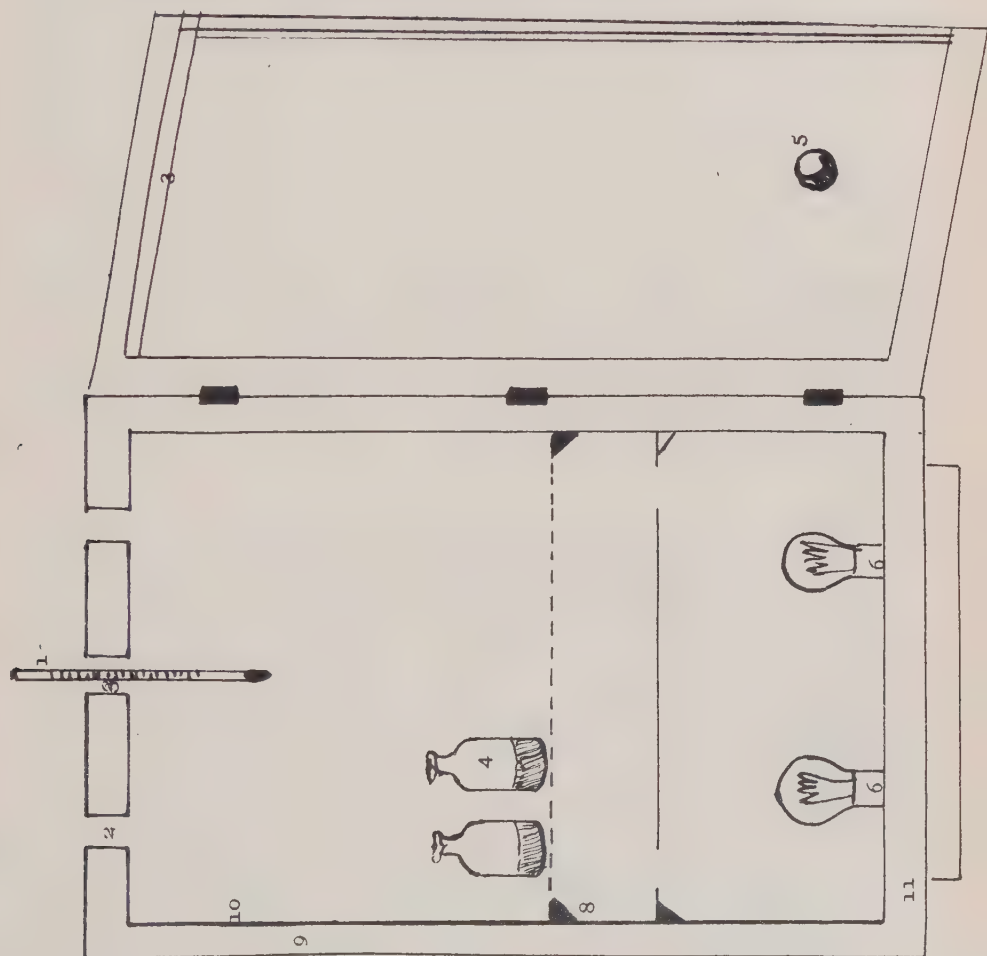
Dans ces conditions, nous avons observé aussi bien des résultats satisfaisants que, parfois, des tests perturbés. Il semble donc que les conditions de température et de durée indiquées ci-dessus peuvent convenir parfaitement aux cultures de *Neurospora* et que leurs variations, dans ces limites, ne soient pas susceptibles de troubler la croissance normale de cet organisme.

Pour la commodité de nos essais en séries, nous avons construit une étuve spécialement réservée aux cultures de *Neurospora*. Nous reproduisons ci-contre son schéma (fig. V) qui nous dispensera d'une longue description.

Cette étuve, facilement réalisable, possède une double paroi en contre-plaqué, avec isolement thermique par de la « laine de verre ». L'intérieur peint en noir, est aménagé de la façon suivante : à la partie inférieure se trouvent deux ampoules électriques de puissance différente (15 et 25, ou 25 et 40 watts) commandées par deux interrupteurs externes distincts qui assurent un chauffage réglable. Deux plateaux à trous en chicane et montés sur crémaillère isolent une partie supérieure obscure où sont disposés les récipients (tubes ou flacons) pour culture. Des orifices à la partie supérieure et inférieure de l'étuve permettent une certaine circulation d'air dans celle-ci.

FIGURE V

SCHEMA DE L'ETUDE CONÇUE ET RESERVEE
POUR LES CULTURES DE *NEUROSPORA*



1. Thermomètre.
2. Orifices supérieurs d'aération.
3. Porte à double paroi.
4. Cultures.
5. Orifice inférieur d'aération.
6. Lampes 15, 25 ou 40 watts.
7. Interrupteurs des lampes.
8. Plateaux sur crémaillères réglables.
9. Double paroi.
10. Laine de verre.
11. Joint de caoutchouc mousse.

Par tâtonnements on ajuste facilement la partie haute de cette étuve à la température désirable, d'abord en allumant une ou deux lampes (en général une puissance de 15 à 25 watts a été suffisante) et accessoirement en éloignant plus ou moins les plateaux de la source de chauffage, ou en réglant la circulation d'air.

Dans la pratique, ces réglages ayant été faits une fois pour toutes, nous avons ainsi une étuve qui, en l'absence de grosses variations de la température ambiante (15 à 20° C. dans notre laboratoire, suivant la saison) maintenait sa propre température constante à 1° près entre 26 et 30° C., sans le moindre thermostat.

Cette solution commode nous a permis de réserver ainsi une étuve à fonctionnement constant et régulier uniquement pour nos cultures en série de *Neurospora*, alors qu'une deuxième étuve était déjà largement utilisée pour nos autres opérations (stérilisation de verrerie, dessiccation des thalles, révélation des chromatogrammes, etc...).

Nous avons voulu également éliminer comme cause de perturbation dans nos tests au *Neurospora* tout facteur extrinsèque provenant de la verrerie ou des milieux de culture utilisés.

Récipients :

La pratique en série du test au *Neurospora* immobilise un assez grand nombre de flacons pour les cultures en milieu liquide. Dans un laboratoire non spécialisé on peut être amené à utiliser ainsi pour ces cultures des Erlenmeyers qui ont déjà servi à diverses opérations chimiques et qui, plus ou moins bien nettoyés, peuvent contenir des traces de produits susceptibles de modifier le développement normal du *Neurospora*. Pour obvier à cet inconvénient, nous avons fait usage d'une verrerie spécialement réservée à ces dosages microbiologiques, et en même temps rigoureusement propre et stérile.

Une solution pratique et économique, évitant la constitution d'un gros stock d'Erlenmeyer, a été trouvée dans l'usage pour nos cultures en milieu liquide, d'un lot d'une centaine de flacons de verre ordinaire (de 90 ou 125 ml) du type flacon rond standard « pharmacie » normalisé I.N.E., qui sont maintenant d'un usage courant en officine. Ces flacons, qui conviennent parfaitement aux cultures, présentent les avantages suivants : ils sont économiques, se nettoient facilement, supportent très bien les stérilisations (tant à l'étuve à 170°, qu'à l'autoclave à 115-120° C.) et ils comportent une graduation à 25 ml. que nous avons trouvée assez exacte et qui facilite la répartition du milieu liquide en quantité constante.

Le nettoyage de la verrerie a été effectué rigoureusement par simple brossage énergique à l'eau tiède, suivi de nombreux rinçages à l'eau ordinaire, puis à l'eau distillée, à l'exclusion de tout produit chimique (détergent ou autre) susceptible d'être mal éliminé et par suite d'entraver les cultures du *Neurospora*.

La stérilisation a été effectuée enfin par chauffage d'une heure à l'étuve, entre 160 et 170° C.

Les milieux de culture (aussi bien milieu moût-agar pour la conservation des souches, que milieu liquide pour l'exécution du test) ont été préparés soigneusement d'après les indications techniques exposées précédemment et en utilisant pour l'ensemble de nos essais le même stock de produits purs, rigoureusement essayés, et réservés à cet effet.

Nous avons ainsi éliminé la possibilité d'introduction fortuite dans nos milieux, lors d'un renouvellement de stock, d'impuretés (comme par exemple des traces d'oligo-éléments) susceptibles d'agir comme stimulant ou comme inhibiteur du développement normal du *Neurospora*.

Tous nos milieux de culture, répartis dans une verrerie (tubes ou flacons) déjà rigoureusement stérilisée à sec, ont été eux-mêmes stérilisés pendant 15 minutes à 115° C. à l'autoclave.

Enfin, nous nous sommes efforcés, dans la mesure du possible, d'utiliser des milieux de préparation récente.

De la sorte, les flacons contaminés accidentellement par des moisissures, soit avant, soit après ensemencement avec le *Neurospora*, ont été trouvés assez rares et ont d'ailleurs été écartés de nos essais.

b) FACTEURS INTRINSEQUES

Ayant ainsi éliminé les principaux facteurs extrinsèques de perturbation du test au *Neurospora*, nous avons voulu examiner les facteurs intrinsèques, dépendant de la souche elle-même.

L'entretien des souches...

..de *Neurospora crassa* « inositolless » a été réalisé par repiquages successifs sur milieu moût-agar et conservation dans notre étuve spéciale à 25-30° C. La plupart du temps un repiquage effectué tous les 15 jours environ nous a paru suffisant. Dans quelques cas où les souches manifestaient une certaine perte de vitalité, nous avons effectué aussitôt des repiquages plus fréquents.

Pour nos dosages nous n'avons utilisé que des souches d'aspect florissant, et nous en avons prélevé les spores (spores de coloration rose-saumon s'accroissant à la lumière) qui se développent électivement à la partie supérieure du tube de gélose inclinée.

Nous avons bien pris soin, lors de ce prélèvement, de ne pas râcler la surface du milieu solide (riche en facteurs de croissance et contenant du méso-inositol) au point d'en introduire accidentellement dans nos milieux de culture liquide et de troubler ainsi le test au *Neurospora*.

Age des souches.

Nous avons cherché à savoir si l'âge des souches utilisées (exprimé en jours depuis leur repiquage) pouvait influencer le développement ultérieur du *Neurospora* dans les conditions habituelles du test.

Nous résumons dans le tableau ci-dessus (*tableau II*) les résultats de notre étude statistique effectuée dans ce sens et portant sur 29 tests diffé-

rents où l'âge des souches utilisées a varié respectivement entre 3 et 27 jours. La qualité des résultats a été chiffrée arbitrairement de 0 à 4, en tenant compte du développement plus ou moins important de la culture et de la régularité de la courbe de croissance, qui sont les deux facteurs essentiels d'appréciation pour un dosage correct.

TABLEAU II

INFLUENCE DE L'ÂGE DES SOUCHES UTILISÉES SUR LA QUALITÉ DU TEST AU *NEUROSPORA CRASSA*

(Etude de 29 courbes de croissance différentes)

Nombre de cas observés	Âge des souches (en jours depuis le repiquage)	Résultats chiffrés
2	4 et 4	0 = Inutilisable
2	3 et 9	1 = Médiocre
8	3-8-8-9-10-10-10 et 17	2 = Acceptable
11	3-4-6-6-6-10-12-13-18-21-27	3 = Bon
6	3-4-9-10-11 et 12	4 = Excellent

L'examen de ce tableau montre que dans 25 cas nous avons obtenu des résultats satisfaisants avec des souches dont l'âge variait de 3 à 27 jours depuis leur repiquage.

Dans quatre cas seulement nous avons obtenu de mauvais résultats (dans des conditions apparemment identiques) avec des souches âgées de 3, 4 et 9 jours respectivement. Il ne semble donc pas que la perturbation de ces tests au *Neurospora* puisse être rapportée à l'âge des souches utilisées.

Influence de la proportion de spores introduites.

Nous avons alors recherché si la richesse en spores de l'ensemencement des milieux liquides était susceptible d'influencer le développement ulté-

rieur du *Neurospora* et l'aspect général de la courbe de croissance.

Nous avons ainsi étudié huit courbes de croissance différentes. Dans ces huit tests tous les flacons de milieu liquide ont étéensemencés avec 1 ml. de suspension contenant un nombre variable et connu de spores par mm³ (mesuré avec une cellule compte-globules). Le nombre de spores a varié de 205 à 1.535 éléments, selon les cas. L'âge des souches, précédemment trouvé sans importance, variait de 3 à 24 jours. Les cultures ont été maintenues de 3 à 4 jours à une température de 26 à 30° C. qui a été admise comme convenable et n'a donc varié que dans des limites assez étroites.

Les résultats ont été appréciés comme précédemment, suivant l'aspect de la courbe obtenue et ses possibilités d'utilisation pour un dosage correct, du méso-inositol. Nous avons choisi ainsi comme dose moyenne de référence la dose de 10 µg. de méso-inositol, qui se situe en général dans la partie médiane des courbes de croissance utilisable pour les dosages.

Les résultats de cette étude sont rassemblés dans le tableau suivant (tableau III).

TABLEAU III

INFLUENCE DE LA RICHESSE EN SPORES
DES ENSEMENCEMENTS SUR LE DÉVELOPPEMENT
DU *NEUROSPORA CRASSA*

Essai n°	Conditions de culture		ENSEMENCEMENT Nombre de spores/mm ³	RÉSULTATS	
	Age des Souches	Etuve		Poids de thalle pr. 10 µg. Inositol	Qualité de la courbe de croissance
1	24 jours	3 j. à 29°	205	2 mg.	Bonne
2	8 —	3 j. à 29°	343	15 mg.	Bonne
3	10 —	4 j. à 30°	360	2,5 mg.	Médiocre
4	9 —	4 j. à 29°	550	15 mg.	Médiocre
5	3 —	3 j. à 29°	580	3 mg.	Acceptable
6	8 —	3 j. à 27°	1.000	12 mg.	Médiocre
7	12 —	3 j. à 26°	1.315	11 mg.	Bonne
8	4 —	4 j. à 30°	1.535	5,5 mg.	Nulle

L'examen de ce tableau montre que les résultats variables obtenus (aussi bien le degré de croissance du *Neurospora*, que la régularité des courbes) sont sans rapport direct avec la richesse en spores des ensemencements.

En effet, les ensemencements les plus pauvres (à 205 et 343 éléments/mm³) ont fourni une bonne courbe de croissance et respectivement 2 et 15 mg. de thalle pour 10 µg. de méso-inositol. D'autre part, les 2 ensemencements les plus riches (à 1.315 et 1.535 éléments/mm³) ont fourni l'un une bonne courbe avec 11 mg. de thalle pour 10 µg. de méso-inositol, et l'autre une courbe irrégulière inutilisable, avec 5,5 mg. de thalle pour 10 µg. de méso-inositol.

La richesse en spores des ensemencements ne semble donc pas, au moins dans les limites indiquées (soit 200 à 1.500 éléments par mm³ environ) influencer le développement ultérieur du *Neurospora*, ni la régularité de la courbe de croissance.

On remarquera également que (même en ne conservant que les tests normaux où le développement du *Neurospora* croît avec les proportions de méso-inositol introduites) le poids de thalle obtenu en présence d'une quantité fixe d'inositol varie avec chaque souche et avec l'ensemble des autres conditions opératoires (celles-ci étant cependant assez fixes).

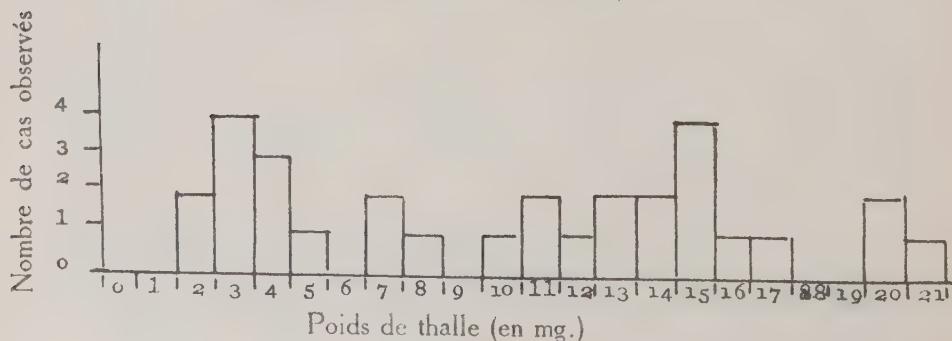
C'est ainsi que, au cours de 30 tests au *Neurospora*, nous avons observé, en présence d'une quantité fixe de 10 µg. de méso-inositol, des poids de thalle variant selon les cas, de 2 à 21 mg. (valeurs extrêmes) avec une plus grande fréquence entre 7 et 17 mg. Le graphique ci-dessous (figure VI) exprime clairement le détail de ces résultats.

Tous ces résultats soulignent bien le fait que, même dans des conditions opératoires assez semblables, on ne saurait rapporter en valeur absolue un poids de thalle de *Neurospora* à une quantité fixe de méso-inositol. Il est donc absolument nécessaire pour chaque dosage microbiologique de refaire une nouvelle gamme-témoin de méso-inositol.

FIGURE VI

POIDS DE THALLE DE *NEUROSPORA CRASSA* OBTENUS EN PRÉSENCE DE 10 g. DE MESO-INOSITOL

(Etude de 30 Essais différents)



CONCLUSIONS

Nous avons étudié et indiqué les meilleures conditions opératoires à réaliser pour effectuer correctement un test au *Neurospora* avec les meilleures chances d'obtenir de bons résultats.

Cependant, il arrive parfois que, malgré tout le soin apporté à son exécution, le test au *Neurospora* se révèle défectueux, soit qu'un ou plusieurs flacons se trouvent accidentellement contaminés, soit que le développement normal du *Neurospora* lui-même ait été perturbé.

Notre étude a montré que les causes essentielles de ces perturbations, probablement intrinsèques, ne sont cependant en rapport ni avec l'âge des souches de *Neurospora*, ni avec la richesse en spores des ensemencements.

On pourrait peut-être à ce sujet invoquer l'instabilité éventuelle du mutant « inositolless » de *Neurospora crassa* et émettre l'hypothèse d'une mutation progressive des souches au cours des repiquages successifs les rendant impropres au dosage microbiologique du méso-inositol. Cela n'est pas impossible, au moins dans certains cas, et d'ailleurs nous n'avons pas hésité (grâce à l'aide bienveillante du Professeur W.H. SCHOPFER) à renouveler complètement nos souches chaque fois que cela nous a paru nécessaire.

Mais cette seule hypothèse d'une mutation progressive ne paraît pas susceptible d'expliquer tous les cas d'irrégularités observés. En effet, nous avons obtenu de bons résultats avec un mutant « inositolless » de *Neurospora* datant de plus de 10 mois (et repiqué plus de 20 fois), alors que deux autres souches qui nous avaient donné satisfaction au départ ont ensuite fourni de mauvais résultats après 14 jours (et 2 repiquages) seulement.

La cause essentielle de certaines irrégularités observées demeure donc indéterminée. Heureusement celles-ci ne constituent pas la règle générale, et il ne faut pas hésiter, éventuellement, soit à changer de souche, soit à recommencer un test microbiologique défectueux.

Ainsi envisagé, et convenablement effectué, le test au *Neurospora* fournit généralement des résultats satisfaisants et spécifiques.

CHAPITRE III

CARACTÉRISATION DES INOSITOLS PAR CROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

Les travaux de P. FLEURY, J.E. COURTOIS et P. MALANGEAU ont montré la possibilité de séparer le méso-inositol du seyllitol en utilisant la chromatographie sur papier, et de caractériser ensuite ces deux substances isomères, même en très faibles quantités de l'ordre de 10 μ g., par la réaction colorée de SCHERER-GALLOIS.

Nous avons suivi pour toutes les déterminations la technique de chromatographie descendante étudiée et mise au point par P. MALANGEAU (32). Nous indiquerons simplement ici l'essentiel de cette technique.

a) MATÉRIEL

Nous avons adopté le matériel entièrement en verre préconisé par P. MALANGEAU et qui s'est révélé à la fois commode et économique. L'enceinte est constituée essentiellement par une grande cuve rectangulaire en verre moulé aux dimensions suivantes : hauteur, 50 cm., longueur, 36 cm., largeur, 23 cm. (*).

Le bord supérieur de cette cuve doit être dressé à la meule, et il est obturé par une plaque de verre épais, rectangulaire, percée d'un trou en son centre. L'étanchéité, qui peut être parfaite par un peu de vaseline, est satisfaisante ainsi.

On dispose dans la partie supérieure de cette enceinte, sur un support, un auget en verre avec ancre, et des tiges de verre disposées parallèlement et destinées à recevoir les papiers à chromatographie. Un cristalliseur est déposé dans le fond de la cuve pour recevoir du solvant.

Nous reproduisons dans le schéma suivant (*figure VII*) l'ensemble de cet appareillage.

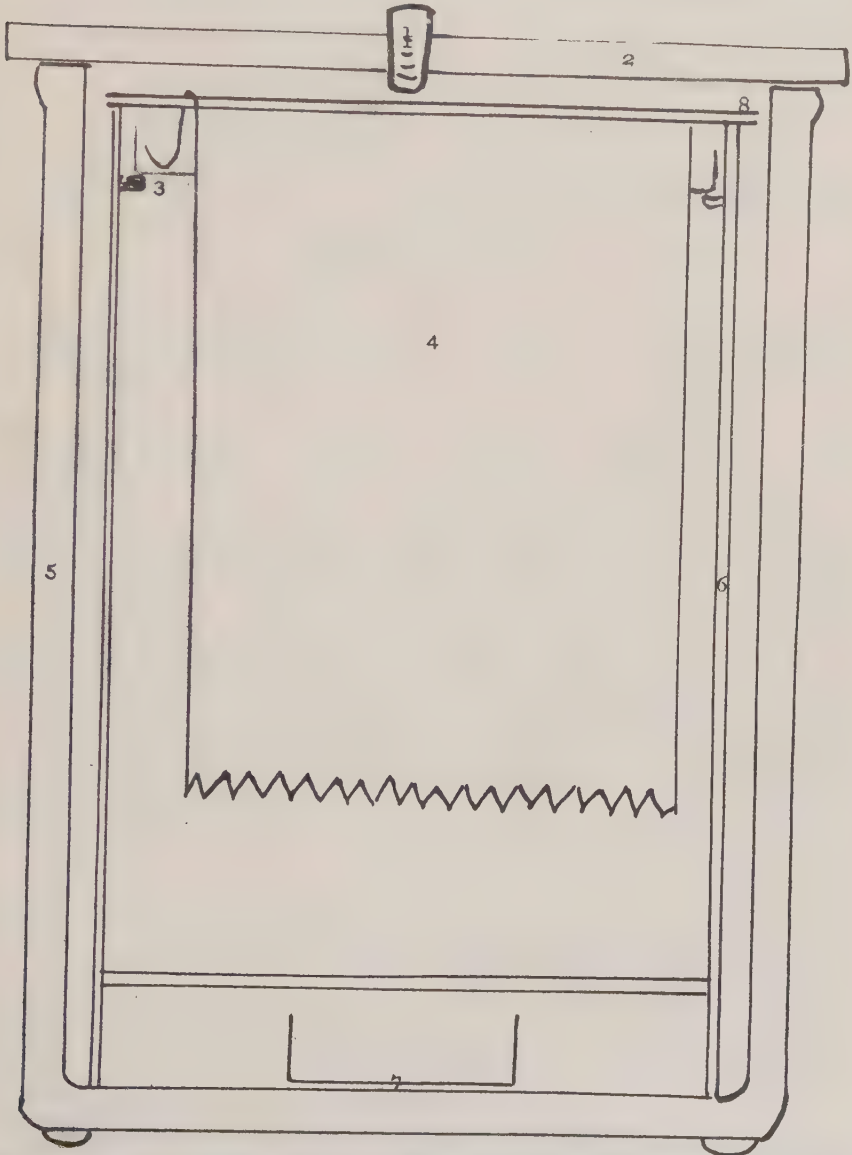
b) PRÉPARATION DES CHROMATOGRAMMES

Nous avons utilisé avec des résultats satisfaisants le papier d'Arches 1030, que l'on peut se procurer facilement dans le commerce. Ce papier est découpé en feuilles rectangulaires de 22 $\times$ 35 cm. environ. Parallèlement à un petit côté, et à 8 cm. de celui-ci, on trace au crayon noir une ligne dite « ligne de départ » sur laquelle on indique d'un petit trait un certain nombre d'emplacements séparés les uns des autres de 3 cm. au moins.

(*) Ces cuves, normalement construites pour servir de bacs d'accumulateurs, sont fabriquées par les Etablissements Saint-Gobain.

FIGURE VII

CUVE A CHROMATOGRAPHIE DESCENDANTE



1. Bouchon. — 2. Couvercle. — 3. Auget. — 4. Papier à chromatographie.
— 5. Cuve. — 6. Support. — 7. Cristalliseur. — 8. Tiges de verre

Sur ces emplacements on dépose à l'aide d'une micropipette graduée en mm^3 des quantités connues et suffisantes de solution-étalon d'inositols (méso-inositol + scyllitol) de façon à réaliser une gamme de quantités croissantes, par exemple : 10, 20, 30, 40, 50 et 60 μg . d'inositol respectivement. Il convient de veiller à ce que les taches de solution ainsi déposées ne dépassent pas 8 à 10 mm. de diamètre.

On dépose de la même façon à des emplacements voisins des volumes connus des solutions d'inositol à examiner. Lorsque les taches sont sèches, on peut introduire les papiers dans la cuve à chromatographie.

c) DÉVELOPPEMENT

On dépose dans le cristallisateur, au fond de la cuve, environ 100 ml du solvant suivant :

Alcool méthylique pur (99°5)	900 ml.
Eau distillée	100 ml.

On met alors en place le (ou les) papier (s) à développer, en veillant à ce que la ligne de départ soit un peu au-delà de la tige horizontale sur laquelle s'appuie le papier, l'extrémité supérieure de celui-ci étant fixée dans l'auget par son ancre de verre. L'enceinte est refermée hermétiquement.

Le tout est maintenu environ 18 heures à la température du laboratoire. On introduit alors rapidement dans l'auget (en enlevant le bouchon du couvercle et en s'aidant d'un entonnoir) une quantité suffisante du solvant ci-dessus, et l'on referme soigneusement.

La course du solvant, qui progresse par capillarité dans le papier, est comptée depuis le moment où celui-ci atteint la ligne de départ et arrêtée après 90 minutes. Dans ces conditions, le front du solvant n'atteint pas la partie inférieure du papier.

On retire alors le papier de la cuve et on le laisse sécher à l'air libre. On termine la dessiccation à l'étuve, entre 85 et 100° C.

d) REVELATION

Les inositols sont révélés sur les chromatogrammes par la réaction de SCHERER-GALLOIS, en utilisant successivement les deux réactifs suivants :

Réactif I : préparé en diluant au 1/3 le réactif de G. MEILLERE (35) qui répond lui-même à la formule suivante :

Oxyde mercurique rouge	5 g.
Acide nitrique officinal (D = 1,39)	5 g.
Eau distillée Q.S.P.	100 ml.

Réactif II: préparé en mélangeant :

Solution aqueuse d'acétate de baryum à 10 %	15 ml.
Acide acétique pur Q.S.P.	100 ml.

Suivant les indications de P. MALANGEAU (32) on effectue sur les papiers à révéler une pulvérisation régulière du réactif I (réactif de MEILLERE dilué au 1/3), à l'aide d'un pulvérisateur type VAAST (qui peut être, pour plus de commodité, relié à une soufflerie à pied ou à moteur).

Les papiers ainsi imprégnés sont portés pendant 10 minutes à l'étuve à même température comprise entre 85 et 100° C. Ils sont alors soumis à une deuxième pulvérisation identique de réactif I et à un deuxième séjour à l'étuve de 5 minutes seulement.

On soumet ensuite les papiers à 5 pulvérisations successives de réactif n° II, alternant avec des séjours de 2 minutes à l'étuve (toujours entre 85 et 100° C.).

Les taches révélatrices des inositols apparaissent alors plus ou moins rapidement, selon la concentration de ceux-ci. Ces taches sont d'une couleur rose-saumon d'intensité variable. Elles ont tendance à s'atténuer et même à disparaître à la longue (après un temps de l'ordre de plusieurs mois). On doit donc les matérialiser dès la révélation en les entourant d'un trait de crayon, afin de conserver l'aspect essentiel du chromatogramme.

On peut aussi assurer la conservation des taches elles-mêmes en pulvérisant sur le papier une solution de paraffine à 1 pour 100 dans le xylol, ou plus simplement en immergeant le papier dans une solution aqueuse de chlorure de sodium à 0,25 ou 0,50 g. pour 100. Le papier essoré est ensuite séché à l'étuve.

e) INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les deux isomères apparaissent nettement séparés sur les chromatogrammes : les taches correspondant au scyllitol sont situées sur la ligne de départ, celui-ci n'ayant pas été déplacé par le solvant méthanol-eau, alors que les taches correspondant au méso-inositol se retrouvent plusieurs centimètres en-dessous.

La réaction est extrêmement sensible et permet de déceler des doses d'inositol de l'ordre de 10 µg., à condition que ces doses n'aient pas été dispersées sur une surface dépassant 0,5 cm².

On remarque que l'étendue des taches, et dans une certaine mesure également l'intensité de leur coloration, sont proportionnelles aux quantités d'inositols présentes. Ceci est vrai principalement pour le méso-inositol.

On peut ainsi évaluer approximativement par chromatographie les quantités de méso-inositol contenues dans une solution en comparant les taches qu'elle fournit avec celles de la gamme-étalon d'inositols.

Il convient enfin de noter que la réaction de SCHERER-GALLOIS est entravée en présence de chlorures, et qu'au-delà d'une certaine concentration en sels elle peut même ne pas apparaître. C'est pourquoi la recherche des inositols urinaires doit s'effectuer, comme nous le verrons plus loin, sur des extraits désionisés.

DEUXIÈME PARTIE

EXTRACTION DES CYCLITOLS URINAIRES
PAR LES RÉSINES ÉCHANGEUSES D'IONS

CHAPITRE PREMIER

TECHNIQUE D'EXTRACTION ORIGINALE DE P. MALANGEAU

Pour l'obtention d'extraits urinaux purifiés, riches en inositols, et nécessaires à nos recherches ultérieures, nous avons eu recours aux résines échangeuses d'ions déjà préconisées par P. BOULANGER, G. BISERTE et F. COURTOT (5) pour l'étude des amino-acides urinaux.

Nous avons tout d'abord étudié la technique originale mise au point par M. P. MALANGEAU (32) en vue de ses travaux sur la séparation des inositols. Nous reproduisons ci-dessous l'essentiel de cette technique.

a) PRINCIPE

L'urine à examiner est débarrassée de la totalité des substances ionisables qu'elle contient, par passages successifs sur deux colonnes de résines, l'une échangeuse de cations, l'autre échangeuse d'anions, soit en l'occurrence :

1° *Permutite* « 50 » : qui fixe d'une façon générale tous les cations, ainsi que l'urée, la plupart des amino-acides et les polypeptides de faible poids moléculaire (P. BOULANGER et G. BISERTE, 4).

2° *Déacidite* « 300 » (*) : qui fixe tous les anions, ainsi que les amino-acides dicarboxyliques (G. BISERTE et P. BOULANGER, 3) et le glucose.

b) PRÉPARATION ET ENTRETIEN DES COLONNES

Les colonnes sont essentiellement constituées par des allonges cylindriques en verre de 30 à 35 mm. de diamètre et de 50 à 60 cm. de haut, qui peuvent contenir de 200 à 250 g. de résine sèche. Leur partie inférieure est munie d'un queusot raccordé à un tube de caoutchouc muni d'une pince de Mohr à vis qui permet de régler leur débit.

(*) Ces 2 résines sont livrées par les Etablissements PHILLIPS et PAIN, à Montrouge (Seine).

Les résines brutes sont tout d'abord tamisées par passages sur tamis n° 25 et n° 50, en ne conservant que les particules de dimensions moyennes. On obtient ainsi des résines homogènes qui favoriseront un passage régulier des liquides. Il convient également de les laisser gonfler par contact avec l'eau pendant 12 à 24 heures.

Enfin, les résines doivent être purifiées par lavages à l'eau suivis de décantation, puis par un traitement chimique approprié. La Permutite « 50 » est ainsi traitée trois fois de suite par l'acide chlorhydrique fort (environ 5 N), puis par lavages à l'eau. La Déacidite « 300 » est traitée alternativement par l'acide chlorhydrique environ normal, puis par la soude N/2, et on termine par d'abondants lavages à l'eau.

La partie inférieure des colonnes est garnie d'un tampon de coton de verre, puis chaque colonne est remplie de façon homogène, soit de Permutite, soit de Déacidite, en quantité suffisante. On recouvre la partie supérieure de la résine d'un tampon de coton de verre qui la maintiendra en place.

Pour l'usage, les colonnes garnies sont préparées (et elles sont également régénérées après chaque extraction urinaire) de la façon suivante :

1° Pour la Permutite « 50 » : Faire passer sur la colonne, goutte à goutte, 1 litre d'acide chlorhydrique officinal dilué au 1/5°. Laver ensuite en faisant passer goutte à goutte 5 litres d'eau distillée.

2° Pour la Déacidite « 300 » : Faire passer goutte à goutte, sur la colonne, 1 litre de lessive de soude officinale diluée au 1/8° et laver ensuite avec 10 litres d'eau distillée.

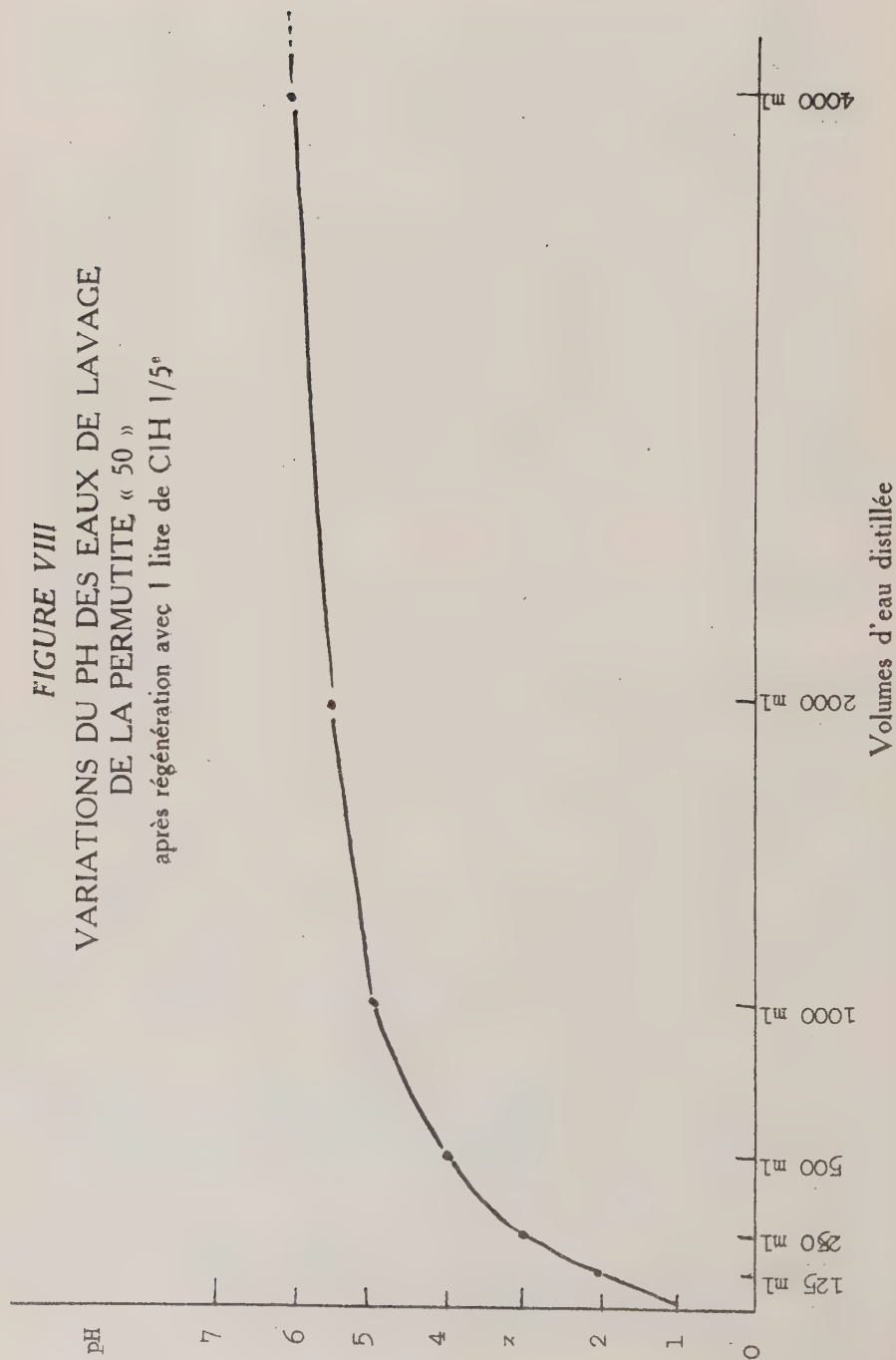
L'expérience nous a montré que l'on pouvait réduire un peu ces quantités d'eau distillée. De toutes façons nous avons toujours contrôlé à l'aide de papiers indicateurs le pH des eaux de lavage, et nous n'avons arrêté cette opération que lorsque les eaux de lavage s'écoulaient neutres depuis un certain temps, ce qui nécessite pratiquement plusieurs litres d'eau distillée (nous en avons toujours utilisé un minimum de 5 litres).

Voici d'ailleurs, à titre d'exemple, la courbe que nous avons obtenue en mesurant d'une part le pH des eaux de lavage par la méthode colorimétrique, et d'autre part le volume d'eau distillée utilisé dans la régénération de la permutite après traitement par un litre d'acide chlorhydrique au 1/5° (*figure VIII*).

Les colonnes ainsi préparées conviennent au traitement de 100 à 125 ml. d'urine. On les conservera sous eau distillée pour éviter qu'elles ne se fissurent en se desséchant.

FIGURE VIII

VARIATIONS DU PH DES EAUX DE LAVAGE
DE LA PERMUTITE « 50 »
après régénération avec 1 litre de ClH 1/5°



c) PRÉPARATION DES EXTRAITS URINAIRES

L'urine est passée en premier lieu sur la Permutite « 50 ».

On laisse d'abord s'écouler la colonne pour la priver de son excédent d'eau (on s'assure de la neutralité du liquide effluent, sinon on effectue un lavage préliminaire de la résine avec une quantité suffisante d'eau distillée; en général 200 à 500 ml. sont suffisants).

On fait alors passer sur la colonne de Permutite 100 ml. exactement mesurés d'urine limpide, filtrée si nécessaire. On laisse s'écouler goutte à goutte jusqu'à ce que, la totalité des 100 ml. ayant été versés, le niveau de l'urine affleure la partie supérieure de la résine. On arrête l'écoulement et on fait repasser au haut de la colonne les premières portions de liquide effluent recueillies dans une capsule de verre Pyrex de capacité suffisante. On laisse en contact 20 minutes.

On laisse à nouveau s'écouler goutte à goutte jusqu'à affleurement du liquide à la partie supérieure de la résine.

Après un nouveau contact de 20 minutes, on laisse s'écouler le liquide et on lave la colonne avec 250 ml. d'eau distillée coulant goutte à goutte. Les écoulements doivent se faire à une cadence assez lente, de l'ordre de 15 gouttes à la minute.

La totalité des liquides effluents (extractum + eaux de lavages), soit environ 350 ml. recueillis dans la capsule, est concentrée au bain-marie bouillant jusqu'à environ 80 à 100 ml.

On filtre pour éliminer les fines aiguilles brun noir d'acide urique et d'acides organiques chargés de pigments qui ont tendance à se former par refroidissement, et on rince le filtre avec un peu d'eau distillée.

Les quelque 100 ml. ainsi recueillis de liqueur, débarrassés des cations et fortement acide ($\text{pH} = 1$ environ), sont traités, de la même façon que précédemment, dans la colonne de Déacidite « 300 » qui fixe les anions. Après deux contacts de 20 minutes on laisse écouler goutte à goutte et on lave avec 250 ml. d'eau distillée.

La liqueur finalement recueillie dans une capsule de verre Pyrex est concentrée et évaporée à sec au bain-marie. Le résidu sec est repris avec soin en trois fois par 2 ml. d'eau distillée, en essayant de le solubiliser au mieux avec un petit agitateur et transvasé en totalité dans un petit flacon (type flacon à antibiotiques) préalablement taré et numéroté. On évapore à sec au bain-marie et on termine l'opération dans un dessiccateur à vide sur gel de silice.

Les extraits secs d'urines desionisées ainsi obtenus se conservent parfaitement en attendant d'être soumis aux examens ultérieurs, et ne sont pas

spécialement hygroscopiques. Ces extraits sont incolores ou plus ou moins teintés (de jaune pâle à jaune brunâtre), avec une apparence parfois cristalline et parfois résineuse.

On a soin de régénérer chaque colonne aussitôt après usage, par traitement à l'acide chlorhydrique ou à la soude diluée, suivi de lavages à l'eau distillée, ainsi qu'il a été indiqué précédemment.

Pour plus de détails concernant l'ensemble de ces opérations, on se reportera utilement à la thèse de M. P. MALANGEAU (32). Il convient de remarquer avec celui-ci que si cette technique de purification des urines repose sur un principe assez simple, elle présente le seul inconvénient de consommer beaucoup de temps et d'eau distillée. En effet, le passage goutte à goutte des urines et surtout des liquides de régénération des nombreux litres d'eau de lavage nécessite au total, si l'on y ajoute encore les heures d'évaporation au bain-marie, un temps considérable. La préparation d'un seul extrait urinaire requiert ainsi 15 à 20 litres d'eau distillée (coulant goutte à goutte) et l'ensemble des opérations d'extraction s'étend sur une trentaine d'heures.

On conçoit donc que, même en disposant d'un certain nombre de colonnes, on soit astreint à un important travail de surveillance, et que cette technique, par ailleurs avantageuse, ne permette pas d'aborder des recherches en très grandes séries.

CHAPITRE II

MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE D'EXTRACTION QUANTITATIVE SATISFAISANTE

Avant d'aborder l'étude de l'inosurie avec la technique d'extraction urinaire proposée par M. P. MALANGEAU (32) et décrite ci-dessus, il nous a paru nécessaire de vérifier le comportement des résines échangeuses d'ions vis-à-vis : 1° de solutions titrées d'inositol ; 2° d'urines surchargées en inositol.

En effet les recherches de M. P. MALANGEAU visaient seulement à caractériser les inositols urinaires, alors que notre travail visait en outre le dosage du méso-inositol. Nos premiers essais avec la technique précédente nous ayant conduit précisément à des pertes importantes en inositol, nous avons dû mettre au point une technique d'extraction quantitative satisfaisante. Nous résumons ci-dessous les essais que nous avons effectués dans ce sens.

a) ETUDE DU COMPORTEMENT DES RÉSINES ÉCHANGEUSES D'IONS, VIS-A-VIS DE SOLUTIONS TITRÉES DE MÉSO-INOSITOL

Pour cette série d'essais nous avons utilisé une solution titrée de méso-inositol à 0,90 g. pour 1.000 (soit M/200) à la dose de 100 ml., correspondant ainsi à une prise d'essai de 90 mg. en méso-innositol.

Ces 100 ml. de solution titrée ont été passés sur Déacidite, puis sur Permutite, selon la technique originale de M. P. MALANGEAU, décrite ci-dessus pour les extraits urinaires.

Sur les liquides effluents, évaporés et ramenés à 100 ml. exactement, nous avons dosé l'inositol par la méthode volumétrique (voir première partie, chapitre I).

1° Contrôles sur Permutite « 50 »

Nous avons effectué deux essais successifs comportant passage sur nos colonnes de Permutite « 50 » de 100 ml. de solution titrée à 90 mg. de méso-inositol, selon la technique de M. P. MALANGEAU, avec lavages par 250 ml. d'eau distillée et concentration au bain-marie. Le dosage final par l'acide periodique a donné les résultats suivants consignés dans le tableau IV.

TABLEAU IV

PASSAGE DE 90 Mg. DE MÉSO-INOSITOL (100 ml. Sol. M/200)
SUR PERMUTITE « 50 »

Lavages avec 250 ml. d'eau distillée

ESSAI	INOSITOL en mg. (*)	RETROUVÉ pour 100	INOSITOL RETENU pour 100
1 ^{er} essai	90	100	0
2 ^e essai	90	100	0
(*) Dosages volumétriques à l'acide periodique.			

Il apparaît, d'après ces résultats, que la Permutite ne fixe pas l'inositol en solution aqueuse pure, et qu'un lavage par 250 ml. d'eau distillée permet d'en retrouver la totalité.

2° Contrôles sur Déacidite « 300 »

Nous avons procédé de même avec la Déacidite, c'est-à-dire passage sur cette résine de 90 mg. de méso-inositol (en solution dans 100 ml. d'eau distillée) selon la technique de M. P. MALANGEAU, mais les premiers essais comportant un lavage avec seulement 250 ml. d'eau distillée nous ont conduit à des pertes d'inositol assez importantes (de l'ordre de 15 pour 100).

Devant ces faits se posait la question de savoir s'il s'agissait d'une destruction ou d'une simple fixation de l'inositol par la Déacidité.

En effet, J.-M. LANDUCCI rappelait récemment (28) que les résines échangeuses d'ions fortement basiques étaient susceptibles de dégrader les hexoses. C'est ainsi par exemple que J.-D. PHILLIPS et A. POLLARD (44) ont identifié dans les produits de dégradation des hexoses par les résines du type I.R.A. 400 OH de l'acide glycolique, ainsi que quatre autres acides non identifiés.

Pour écarter éventuellement cette hypothèse d'une destruction partielle de l'inositol avec ouverture du cycle et formation possible de produits réducteurs au contact de la résine, nous avons recherché le pouvoir réducteur des liquides de lavage vis-à-vis de la liqueur de FEHLING. Ces essais effectués à plusieurs reprises se sont toujours montrés négatifs.

Nous avons alors pensé que les pertes observées pouvaient correspondre à une simple fixation partielle de l'inositol, et nous avons cherché à éluer en totalité cette fraction retenue en prolongeant les lavages à l'eau distillée. Au lieu des 250 ml. primitivement employés, nous en avons utilisé ultérieurement 500 et même jusqu'à 700 ml. Les dosages à l'acide periodique nous alors montré que les doses d'inositol ainsi récupérées étaient proportionnelles au volume des eaux de lavage, et que pratiquement une élution bien faite avec 500 ml. d'eau distillée permet de récupérer la quasi-totalité de l'inositol mis en œuvre. Une élution avec 700 ml. permet d'en retrouver la totalité. Enfin, dans les liquides de lavages ultérieurs nous n'avons plus trouvé trace d'inositol dosable par l'acide periodique.

Le tableau n° V ci-joint résume clairement les résultats de ces essais :

TABLEAU V

CONTROLES DE RÉTENTION DE L'INOSITOL PAR LA DÉACIDITE « 300 »

(Méso-inositol mis en œuvre : 100 ml. sol. M/200 = 90 mg.)

ESSAI N°	Volume total des eaux de lavage	Rétention de l'inositol p. 100 (*)	Résultats moyens	
			Inositol retenu pour 100	Inositol retrouvé pour 100
1	250 ml.	20,80	15,70	84,30
2	—	14,10		
3	—	12,20		
4	500 ml.	8,90 (?)	4,87	95,13
5	—	5,50		
6	—	5		
7	—	5		
8	—	4,45		
9	—	2,78		
10	—	2,45		
11	700 ml.	0,96	0,96	99,04

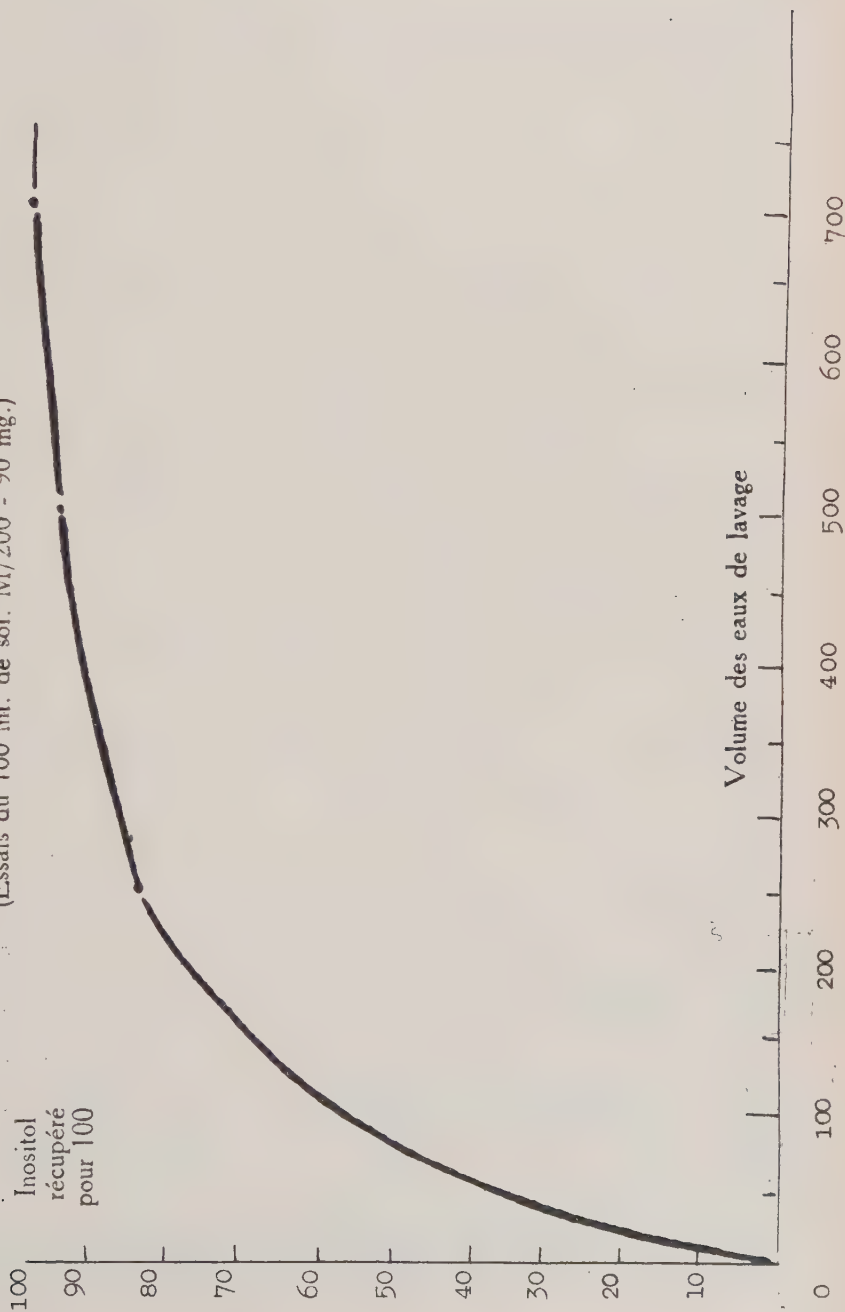
(*) Dosages volumétriques par l'acide periodique.

Nous avons dressé d'autre part avec les résultats moyens de ce tableau une courbe qui traduit encore plus clairement cette proportionnalité de l'élution de l'inositol en fonction du volume des eaux de lavage (figure IX).

FIGURE IX

RETENTION DU MESO-INOSITOL PAR LA DEACIDITE (303)

(Essais du 100 ml. de sol. M/200 - 90 mg.)



Il apparaît donc qu'une élution bien faite avec 500 ml. d'eau distillée permet de retrouver au moins 95 pour 100 de l'inositol mis en œuvre, ce qui nous a paru satisfaisant. Nous avons hésité en effet à utiliser couramment une élution avec une quantité d'eau supérieure, en vue d'un rendement encore meilleur (700 ml. nous avaient permis de retrouver pratiquement la totalité de l'inositol) parce que les évaporations déjà longues avec 500 ml., devenaient alors impraticables.

Dans le but d'obtenir un meilleur rendement avec des volumes moindres, nous avons essayé de remplacer l'eau distillée comme liquide d'élution par des mélanges d'eau et d'alcool éthylique de titres divers.

Nous avons rassemblé dans le tableau VI les résultats de ces essais.

TABLEAU VI

CONTROLE DE RETENTION DE L'INOSITOL

(100 ml. sol. M/200 - 90 mg.) par la DEACIDITE « 300 »

— ELUTIONS HYDRO-ALCOOLIQUES —

ESSAI N°	Volumes d'alcool éthylique utilisés	Inositol retenu pour 100	Inositol retrouvé pour 100 (*)
1	Alcool = 0 Eau dist. = 500 ml.	5	95
2	Alcool à 10° = 125 ml.	32	68
3	Alcool à 10° = 125 ml. puis Alcool à 20° = 125 ml. soit total = 250 ml.	21,6	78,4
4	Alcool à 80° = 250 ml.	41	59
(*) Dosages volumétriques par l'acide periodique.			

Il apparaît que l'alcool faible (10 à 20°), même en quantités relativement importantes (250 ml.) ne donne pas des résultats supérieurs à l'emploi de l'eau distillée (comparer avec les chiffres du tableau V). Quant à l'alcool fort (80°), en quantités équivalentes, il conduit à des fortes diminutions du rendement.

L'élution par 500 ml. d'eau distillée semble donc à la fois la plus simple et la plus recommandable, puisqu'elle permet de retrouver au moins 95 pour 100 de l'inositol mis en œuvre.

Enfin, par un dernier souci d'objectivité, nous avons vérifié que le passage de solutions titrées d'inositol sur les résines et leur élution dans ces conditions n'était pas susceptible de troubler le dosage ultérieur par le test au *Neurospora*. On pourrait en effet supposer que les résines (ou leurs produits de régénération, s'ils étaient mal éliminés) sont susceptibles de laisser passer dans les solutions de méso-inositol qui les traversent des facteurs soit activateurs, soit inhibiteurs de la croissance normale du *Neurospora*.

Pour éliminer cette hypothèse, nous avons effectué un dosage comparatif par l'acide periodique et par le *Neurospora* sur une solution titrée de méso-inositol traitée par les résines et éluee par 500 ml. d'eau distillée comme ci-dessus. Voici les résultats de ces dosages comparatifs :

- (1) Méso-inositol mis en œuvre : 100 ml. sol. M/200 = 90 mg.
- (2) Inositol retrouvé par l'acide periodique = 85 mg.
soit 94,5 pour 100 de (1), proportion
trouvée normale précédemment.
- (3) Méso-inositol retrouvé par le *Neurospora* = 80 mg.
soit 94 pour 100 de (2), quantité
réelle retrouvée après élution.

Ainsi la quantité de méso-inositol dosée par le *Neurospora* dans les liquides d'élution ne diffère que de 6 pour 100 de la quantité réelle, dosée par l'acide periodique. Etant donné la marge d'imprécision obligatoire de la méthode microbiologique qui peut être de l'ordre de 10 pour 100, on peut considérer que les deux chiffres (2 et 3) sont pratiquement superposables, et que les résines échangeuses d'ions ne sont pas susceptibles de perturber les dosages ultérieurs du méso-inositol par le test au *Neurospora*.

Enfin l'ensemble de nos essais montre que le méso-inositol éventuellement fixé par les résines échangeuses d'ions utilisées, puis libéré, n'est pas altéré par celles-ci puisque, ni sa formule, ni même sa configuration spatiale, n'ont été modifiés.

Des recherches de M. P. MALANGEAU (32) poursuivies parallèlement aux nôtres, ont montré que les phénomènes de rétention de l'inositol par les résines sont proportionnelles aux quantités d'inositol mises en œuvre, de

sorte que les pourcentages de rétention ne varient pas avec les concentrations des solutions utilisées. D'autre part, le comportement du scyllitol vis-à-vis des résines est identique.

Dans ces conditions, il nous a paru inutile de reprendre ces essais préliminaires, déjà assez longs, avec des solutions de méso-inositol de titres différents, comme avec des solutions de scyllitol, produit rare actuellement.

b) ETUDE DU COMPORTEMENT DES RESINES ECHANGEUSES D'IONS VIS-A-VIS D'URINES SURCHARGEES EN MESO-INOSITOL

Pour cette nouvelle série d'essais, nous avons utilisé des solutions titrées (M/200) de méso-inositol, non plus dans l'eau distillée, mais dans une « urine » artificielle répondant à la composition constante ci-dessous :

Urée	20 g.
Chlorure de sodium	10 g.
Phosphate monosodique	3,5 g.
Ammoniaque officinale	XX gouttes.
Méso-inositol	900 mg. (exactement pesés)
Eau distillée Q.S.P.	1.000 ml.

Cette « urine » artificielle présente un pH voisin de 6, donc normal.

Nous avons fait passer 100 ml. de cette « urine » (contenant 90 mg. de méso-inositol) successivement sur Permutite « 50 », avec lavages par 250 ml. d'eau distillée, puis sur Déacidite « 300 », avec lavages par 500 ml. d'eau distillée, technique qui nous avait donné satisfaction pour les solutions aqueuses pures d'inositol. Les résultats de ces essais ont été consignés dans le tableau VII.

Nous avons eu alors la surprise de constater que, si le passage sur Déacidite de cette urine conduisait à des pertes en inositol de l'ordre de 3 à 4 pour 100, donc acceptables (essais n^{os} 4 à 7), par contre le passage sur Permutite retenait des quantités beaucoup plus importantes (de 7 à 18 pour 100 environ : essais 1, 2 et 3). Un essai de lavage prolongé (3, 3 bis et 3 ter) par deux fractions complémentaires de 100 ml. d'eau distillée n'a permis de récupérer que 0.43 pour 100 de l'inositol dans la première fraction, et rien dans la seconde.

Nous avons donc cherché un autre moyen pour remédier à cet inconvénient majeur d'une perte importante en inositol des « urines » artificielles après passage sur la Permutite.

En comparant ces derniers résultats avec ceux obtenus par traitement de solutions pures dont l'inositol a été retrouvé à 100 pour 100 (voir tableau IV), nous avons pensé que cette différence de comportement pouvait prove-

nir uniquement de la composition des urines, plutôt que des résines elles-mêmes (et en particulier de la permutite) qui s'étaient montrées au cours de nos essais antérieurs si peu réactives vis-à-vis de l'inositol.

Notre attention s'est ainsi portée que les variations de pH des liquides effluents. En effet, si ces variations sont nulles pour les solutions aqueuses pures d'inositol, qui demeurent neutres, il n'en va pas de même avec les urines passées sur résines échangeuses d'ions, en raison de la salinité du milieu. Avec celles-ci les choses se passent de la façon suivante :

Les urines d'un pH normal de 5,2 à 6,4, traitées par la permutite donnent un liquide effluent, débarrassé des cations, qui est très acide et dont le pH est voisin de 1. Cette liqueur traitée à son tour par la Déacidite, et débarrassée ainsi de ses anions, ressort sensiblement neutre (pH voisin de 7).

Nous avons alors pensé que l'ébullition du milieu fortement acide (pH voisin de 1) — telle qu'elle était pratiquée sur les urines traitées par la permutite en vue de leur concentration au bain-marie, dans le premier temps de la technique originale de M. P. MALANGEAU — était à l'origine des pertes d'inositol observées.

Nous avons donc entrepris une nouvelle série d'essais en neutralisant totalement cette acidité par un léger excès d'ammoniaque ajouté avant la phase d'évaporation. Nous reproduisons ici l'essentiel de cette nouvelle technique et les résultats qu'elle fournit :

100 ml. d'urines (« urines artificielles » contenant 90 mg. de méso-inositol) sont passés sur Permutite « 50 », selon la technique décrite plus haut. On lave soigneusement la colonne avec 250 ml. d'eau distillée. La totalité des liquides effluents très acides et de pH = 1 environ, est traitée par un léger excès d'ammoniaque ajoutée peu à peu jusqu'à réaction franchement alcaline (en général 3 à 5 ml. sont nécessaires).

On concentre au bain-marie bouillant jusqu'à réduction à 80-100 ml. environ, ce qui chasse l'excès d'ammoniaque libre, le reste étant bloqué par les anions.

Cette solution concentrée rigoureusement neutre (pH = 7), est alors passée sur Permutite « 300 » et la résine est lavée par 500 ml. d'eau distillée. La Déacidite ayant retenu les anions, l'ammoniaque qui les neutralisait se trouve libérée dans les liquides effluents qui présentent une forte réaction alcaline.

La totalité des liquides effluents (environ 600 ml.) est concentrée au bain-marie bouillant, ce qui chasse la totalité de l'ammoniaque libérée (comme nous avons pu le vérifier). Remarquons à ce propos que si le chauffage en présence d'ammoniaque risque d'épimériser les oses de l'urine, par contre l'inositol est très stable en milieu alcalin, c'est ainsi qu'il résiste parfaitement au traitement à chaud par la magnésie calcinée (P. FLEURY, J.-E. COURTOIS et A.-L. JOUANNET, 15).

La liqueur concentrée, maintenant rigoureusement neutre et totalement désionisée, est évaporée et ramenée à 100 ml. exactement pour le dosage de l'inositol et par l'acide periodique.

TABLEAU VII

CONTROLE DE RÉTENTION DE L'INOSITOL
« D'URINES ARTIFICIELLES »
PAR LES RÉSINES ECHANGEUSES D'IONS

1° Essais sur Permutite « 50 » :			
ESSAI n°	Volume des eaux de lavage (en ml.)	INOSITOL retenu pour 100 (*)	Moyenne Inositol retenu pour 100
1	250	15	13,3
2	250	7,20	
3	250	17,80	
3 bis	350	17,37	
3 ter	450	17,37	
2° Essais sur Déacidite « 300 » :			
4	500	7,30 (?)	3,7
5	500	4,05	
6	500	3,50	
7	500	0	
3° Essais sur Permutite « 50 » avec neutralisation ammoniacale ultérieure :			
8	250	2,2	2,7
9	250	3,3	
(*) Dosages volumétriques par l'acide periodique.			

Dans ces conditions nous avons pu retrouver, après passage sur la Déacidite suivi de neutralisation par l'ammoniaque, environ 97 pour 100 de l'inositol mis en œuvre (voir Tableau VII - 3°).

Après cette simple modification la perte d'inositol demeure minime dans le premier temps (environ 3 pour 100). Comme celle observée dans le 2^e temps, après passage sur Déacidite et lavage par 500 ml. d'eau distillée, est du même ordre, on peut escompter avec cette technique extraire assez simplement les inositols urinaires avec un rendement global acceptable, voisin de 95 pour 100.

Ce rendement nous a paru satisfaisant pour nos recherches ultérieures basées sur des déterminations chromatographiques et sur le dosage microbiologique par le *Neurospora*.

Avant d'aborder l'étude de l'inosurie avec cette nouvelle technique d'extraction, ainsi modifiée, nous avons voulu la vérifier sur des urines normales. Comme le taux de l'inositol physiologique contenu dans ces urines nous était inconnu, nous avons fait des essais parallèles avec des urines surchargées d'une quantité connue de méso-inositol, afin de voir si nous allions retrouver intégralement cette surcharge après extraction.

Les essais ont été menés parallèlement d'une part sur 100 ml. d'urines normales, et d'autre part sur 100 ml. de ces mêmes urines additionnées d'une surcharge de 20 mg. de méso-inositol.

Après traitement par les résines, nous avons trouvé, respectivement :

(1) Urines normales 100 ml. :	extrait sec désionisé.....	= 40 mg.
(2) Urines normales 100 ml. + 20 mg. méso-inositol :	— — —	= 60 mg.
(3) Différence (2) — (1) :	Chiffre théorique	= 20 mg.
	Chiffre trouvé	= 20 mg.

La surcharge d'inositol se retrouve donc intégralement dans le poids d'extrait sec non désionisé. D'autre part il s'agit bien de méso-inositol non modifié, ainsi que nous avons pu le vérifier par chromatographie. L'évaluation chromatographique a fourni en effet les chiffres suivants :

(4) Urines normales 100 ml. :	méso - inositol par chromatographie	= 0,9 mg.
(5) Urines normales 100 ml. + 20 mg. méso-inositol :	méso - inositol par chromatographie :	
	{ Chiffre trouvé	= 18 mg.
	{ Chiffre théorique ...	= 20,9 mg.

Etant donné le degré d'approximation de dosage chromatographique, nous pensons que ce chiffre est acceptable et qu'il permet de conclure à un rendement satisfaisant de notre nouvelle technique d'extraction, compte tenu des résultats d'ensemble des essais précédents.

CHAPITRE III

PROTOCOLE OPÉRATOIRE MIS AU POINT ET SUIVI POUR NOS RECHERCHES SUR L'INOSURIE PHYSIOLOGIQUE

Nous donnerons simplement l'essentiel du mode opératoire que nous avons mis au point à la suite des essais précédents, et que nous avons adopté pour nos recherches ultérieures sur l'inosurie physiologique, tous les détails techniques, ayant déjà été exposés et discutés dans les chapitres précédents.

1° RÉCOLTE DES URINES :

On recueille et on garde au frais la totalité des urines de 24 heures du sujet à examiner, et on note soigneusement le volume de la diurèse. Il est absolument indispensable de n'ajouter aux urines aucun conservateur, toujours susceptible d'inhiber la croissance du *Neurospora* utilisé pour les dosages.

2° TECHNIQUE D'EXTRACTION :

On pratique l'extraction par les résines échangeuses d'ions sur 100 ml. exactement mesurés d'urines limpides filtrées que l'on fait passer lentement sur une colonne de Permutite « 50 », résine échangeuse de cations.

On laisse en contact 20 minutes et l'on fait repasser une 2^e fois l'urine sur la colonne de résine. Après un 2^e contact de 20 minutes, on lave la colonne avec 250 ml. d'eau distillée coulant goutte à goutte.

La totalité des liquides (extractum et eaux de lavage), soit environ 350 ml. est recueillie dans une capsule de verre Pyrex, neutralisée par un léger excès d'ammoniaque et concentrée au bain-marie jusqu'à 80-100 ml. environ.

L'extractum est filtré, pour éliminer les cristaux d'urate d'ammonium qui se forment par refroidissement, et passé quantitativement sur une colonne de Déacidite « 300 », résine échangeuse d'anions, de la même manière que ci-dessus, mais en effectuant le lavage avec 500 ml. d'eau distillée.

La totalité des liquides recueillis dans une capsule en Pyrex de capacité suffisante est évaporée à sec au bain-marie.

Le résidu sec est repris avec soin en 3 fois par 2 ml. d'eau distillée en essayant de le solubiliser au mieux, et transvasé dans un petit flacon du type flacon à antibiotiques préalablement taré et numéroté. On évapore à sec au bain-marie et on termine l'évaporation dans un dessiccateur à vide sur gel de silice.

On détermine par pesée le poids d'extrait urinaire débarrassé de la totalité des substances ionisables et contenant les inositols.

On trouvera dans les chapitres précédents (2^e partie, chapitres 1 et 2) les détails techniques concernant la préparation, la régénération et l'entretien des colonnes de résine ainsi utilisées.

3° DOSAGE MICROBIOLOGIQUE ET ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE :

Le dosage microbiologique du méso-inositol contenu dans les extraits urinaires s'effectuera à l'aide du test au *Neurospora* (selon la technique décrite au chapitre II de la première partie).

Pour ce faire, il suffit de préparer à partir des extraits urinaires une dilution de titre connu et stérilisée. La solution utilisée pour le dosage doit contenir une quantité optimum d'inosite de l'ordre de 10 µg. par ml. pour que le dosage s'effectue dans les meilleures conditions, ainsi que l'avons montré précédemment.

A cet effet, nous conseillons, d'une façon générale, d'opérer comme suit :

La totalité de l'extrait sec (correspondant à 100 ml. d'urines) est remise en solution dans 1 ml. d'eau distillée, exactement mesuré avec une pipette de précision. Cette solution concentrée est divisée en 2 parties, soit par exemple :

1° 0,5 ml. exactement mesuré qui, dilué à 50 ml. avec de l'eau distillée et stérilisé à l'autoclave pendant 15 minutes, à 115° C., constitue la solution utilisable pour le dosage par le *Neurospora* aux doses de 0,5 à 2 ml. en général.

2° 0,5 ml. restant de solution concentrée (correspondant à 50 ml. d'urines). Cette portion qui pourra être évaporée à sec à nouveau, et conservée facilement pour un dosage de contrôle ultérieur éventuel, servira d'abord à une recherche chromatographique qualitative des inositols, selon la technique de M. P. MALANGEAU (étudiée au chapitre 3 de la première partie). Cette dernière technique se prêtera en outre, à une évaluation approximative des taux de méso-inositol urinaires par comparaison de la surface et de l'intensité de coloration des taches fournies par les extraits urinaires et de celles obtenues avec des quantités connues de méso-inositol (disposées en doses croissantes de 10 à 50 µg).

La pratique préalable de cette évaluation chromatographique approximative nous a permis utilement :

1° de contrôler les résultats de nos dosages par le test au *Neurospora* ;

2° de déterminer la quantité optimum de solution diluée d'extrait urinaire à utiliser dans ces mêmes dosages par le *Neurospora*, afin d'opérer sur des prises d'essai de l'ordre de 10 µg. de méso-inositol.

Les détails techniques de la préparation des réactifs et de l'exécution du test au *Neurospora* ont déjà été étudiés au chapitre 2 de la première partie.

Nous nous contenterons donc d'exposer ici, à titre d'exemple, dans le Tableau VIII, la disposition des essais, suivant un schéma type qui fut souvent utilisé pour nos dosages en séries du méso-inositol dans les extraits urinaires.

Le développement des thalles de *Neurospora*, en fonction des doses de méso-inositol, est apprécié par pesée, et l'on établit avec les résultats de la gamme-témoin une courbe de référence valable pour une seule série de dosages. Les poids de thalle fournis en présence des diverses quantités des divers extraits urinaires sont rapportés à cette courbe qui permet de déduire les teneurs correspondantes en méso-inositol des urines étudiées.

TABLEAU VIII

DOSAGE DU MESO-INOSITOL DANS DES EXTRAITS URINAIRES PAR LE TEST AU NEUROSPORA

Flacon n°	Gamme témoin d'inositol								Solutions d'extraits urinaires à doser						
	1	2	3	4	5	6	7	8	Ext. urine X	Ext. urine Y	Ext. urine Z, etc.				
Milieu liquide	25 ml.	—	—	—	—	—	—	—	→	→	—	—	—	—	—
Sol. Tartrate Amm.	0,4 ml.	—	—	—	—	—	—	—	→	→	—	—	—	—	—
Suspension <i>Neurospora crassa</i> « inositolles »	1 ml.	—	—	—	—	—	—	—	→	→	—	—	—	—	—
Méso-inositol	0 µg.	5 µg.	10 µg.	15 µg.	20 µg.	25 µg.	30 µg.	100 µg.	—	—	—	—	—	—	—
Soit :	0	0,5	1	1,5	2	2,5	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ml.	ml.	ml.	ml.	ml.	ml.	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	0,3	1	0,5	1	2	0,5	1	2	—
							ml.	ml.	ml.	ml.	ml.	ml.	ml.	ml.	ml.
Solutions à doser :															
Extrait urinaire X,															
Y ou Z															

Porter à l'étuve à + 25 à 30° C. à l'obscurité, pendant 3 à 4 jours

TROISIÈME PARTIE

RECHERCHES SUR L'INOSURIE PHYSIOLOGIQUE

CHEZ L'HOMME

CHAPITRE PREMIER

DÉTERMINATION DE L'INOSURIE SUR UN GROUPE DE SUJETS DES DEUX SEXES ET D'AGES DIVERS

En appliquant les techniques décrites au chapitre précédent, nous avons étudié les urines d'un premier groupe de sujets des deux sexes et d'âges divers, apparemment en bonne santé, et soumis à un régime alimentaire normalement équilibré.

Nous avons noté pour chaque urine les taux par litre (et éventuellement par 24 heures quand la diurèse avait été mesurée) :

- 1° d'extrait sec désionisé, obtenu avec les résines échangeuses d'ions;
- 2° de méso-inositol, apprécié par le test au *Neurospora*;
- 3° de méso-inositol évalué par la chromatographie sur papier.

Ces résultats ont été rassemblés dans le tableau IX.

Nous avons ainsi observé dans ces urines de sujets normaux :

— des taux d'extrait sec désionisé variant de 206 à 1.007 mg. par litre (moyenne : 521 mg.);

— des taux de méso-inositol (mesurés par le *Neuroposra*) variant de 12 à 56 mg. par litre (moyenne : 27 mg.).

Enfin l'évaluation approximative du méso-inositol par chromatographie a fourni des chiffres assez voisins : 15 à 72 mg. (moyenne : 27 mg.), qui font apparaître une certaine concordance entre cette méthode et le test au *Neurospora*.

Tous ces chiffres sont de même ordre que ceux trouvés par M. P. MALLANGEAU, (32, 33) et que nous reproduisons ici :

- extrait urinaire : 120-800 mg./l.;
- méso-inositol par chromatographie : 22-30 mg./l. en moyenne;
- scyllitol — — : 15-22 mg./l. en moyenne;
- inositols totaux — : 37-52 mg./l. en moyenne.

Il convient de remarquer que les dosages par l'acide periodique indiquent des teneurs supérieures de substances réductrices, qui évaluées globalement en inositol, se situent entre 60 et 100 mg. par litre. Mais cette méthode, non spécifique, dose à côté des inositols eux-mêmes d'autres substances réductrices tels, par exemple, les produits de dégradation des sucres urinaires sous l'action des résines alcalines (aldéhyde glycérique en particulier).

Ce pouvoir réducteur dosé par la méthode à l'iodomercurate alcalin de BAUDOUIN et LEWIN, et exprimé en glucose (de même poids moléculaire que l'inositol) est de l'ordre de 15 à 20 mg. par litre.

TABLEAU IX

TENEURS EN MESO-INOSITOL DES URINES DE DIVERS
SUJETS NORMAUX

	Taux d'extrait sec désionisé	Taux de méso-inositol	
		par le <i>Neurospora</i>	par Chromato- graphie (*)
M. — 33 ans	206 mg./l.	28 mg./l.	—
F. — 35 ans	424 mg./l.	56 mg./l.	72 mg./l.
F. — 5 ans	618 mg./l.	45 mg./l.	32 mg./l.
F. — 7 ans	302 mg./l.	37 mg./l.	20 mg./l.
F. — 65 ans	1.007 mg./l.	24 mg./l.	40 mg./l.
M. — 70 ans	418 mg./l.	14 mg./l.	15 mg./l.
F. — 60 ans	395 mg./l.	12 mg./l.	15 mg./l.
M. — 3 mois	300 mg./l.	18 mg./l.	19 mg./l.
F. — 19 ans	850 mg./l.	17 mg./l.	20 mg./l.
	745 mg./24 h.	15 mg./24 h.	17,5 mg./24 h.
M. — 34 ans	500 mg./l.	20 mg./l.	18 mg./l.
	675 mg./24 h.	27 mg./24 h.	24 mg./24 h.
F. — 36 ans	715 mg./l.	24 mg.	20 mg./l.
	965 mg./24 h.	32 mg./24 h.	24 mg./24 h.
Valeurs extrêmes :			
3 mois — 70 ans	206-1.007 mg./l.	12-56 mg./l.	15-72 mg./l.
Moyennes :	521 mg./l.	27 mg./l.	27 mg./l.
(*) Evaluations approximatives.			

En conséquence, si nos résultats indiquent des taux de méso-inositol urinaire inférieurs aux taux d'inosurie publiés antérieurement et mesurés avec d'autres méthodes, ils paraissent cependant plus proches de la réalité.

CHAPITRE II

ETUDE DES VARIATIONS DE L'INOSURIE CHEZ DEUX SUJETS NORMAUX SOUMIS AU MÊME RÉGIME ALIMENTAIRE

Afin d'étudier l'influence éventuelle du régime alimentaire, sur les variations de l'inosurie physiologique, nous avons effectué une nouvelle série de déterminations sur deux sujets adultes normaux :

— Sujet n° 1 — M. : Homme de 34 ans.

— Sujet n° 2 — F. : Femme de 35 ans.

Ces deux personnes ont été soumises à un régime alimentaire identique pendant 24 heures (pour chaque essai) et nous avons dosé le méso-inositol dans les urines recueillies pendant les 24 heures suivantes, en notant soigneusement leur volume.

Cette épreuve a été effectuée 4 fois de suite à plusieurs jours, voire plusieurs semaines d'intervalle, en nous efforçant d'instituer à chaque fois un régime équilibré aussi voisin que possible du régime initial.

Nous donnons ci-dessous les résultats qui ont été obtenus dans ces conditions.

a) OBSERVATIONS

ESSAI DU 6 JUILLET 1955 :

Régime alimentaire commun

Petit Déjeuner : Lait, pain beurre.

Déjeuner : Viande : Bifteck.
: Légumes : Petit pois, carottes, salade (laitue).
Fromage : Camembert.
Fruits : Abricots.
Boissons : Vin, thé.

Dîner : Viande : Jambon.
Légumes : Pâtes, salade (laitue).
Fromage : Camembert.
Fruits : Abricots.

RÉSULTATS

TABLEAU X

Sujet	Diurèse	Extrait sec désionisé	MESO-INOSITOL		Présence de scyllitol
			Neurospora	Chromatogra- phie	
N° 1 - M	1.000 ml./24 h.	910 mg./l. 910 mg./24 h.	32 mg./l. 32 mg./24 h.	32 mg./l. 32 mg./24 h.	O
n° 2 - F	1.400 ml./24 h.	700 mg./l. 980 mg./24 h.	16 mg./l. 22.5 mg./24 h.	16 mg./l. 22.5 mg./24 h.	O

ESSAI DU 20 JUILLET 1955 :

Régime alimentaire commun

Petit Déjeuner : Lait, pain, beurre.

Déjeuner : Viande : Bifteck.

Légumes : Betteraves, carottes, salade (laitue).

Fromage : Camembert.

Fruits : Pêches.

Boissons : Vin, thé.

Dîner : Œufs : Omelette.

Légumes : Artichauts.

Salade (laitue).

Fromage : Camembert.

Fruits : Pêches.

RÉSULTATS

TABLEAU XI

Sujet	Diurèse	Extrait sec désionisé	MESO-INOSITOL		Présence de scyllitol
			Neurospora	Chromatogra- phie	
N° 1 - M	850 ml./24 h.	760 mg./l. 650 mg./24 h.	20 mg./l. 17 mg./24 h.	36 mg./l. 31 mg./24 h.	+
n° 2 - F	1.250 ml./24 h.	530 mg./l. 662 mg./24 h	10 mg./l. 12,5 mg./24 h.	14 mg./l. 17,5 mg./24 h.	O

ESSAI DU 5 AOUT 1955 :

Régime alimentaire commun

Petit Déjeuner : Lait, pain, beurre.

Déjeuner : Viande : Jambon.

Légumes : Epinards à la crème, salade (laitue)

Fromage : Camembert.

Fruits : Pêches.

Boisson : Vin, thé.

Dîner : Œufs : Omelette.

Légumes : Epinards à la crème, tomates,
salade (laitue).

Fromages : Camembert.

Fruits : Poires.

RÉSULTATS

TALLEAU XII

Sujet	Diurèse	Extrait sec désionisé	MESO-INOSITOL		Présence de scyllitol
			Neurospora	Chromatogra- phie	
N° 1 - M	1.350 ml./24 h.	500 mg./l. 675 mg./24 h.	20 mg./l. 27 mg./24 h.	18 mg./l. 24 mg./24 h.	O
n° 2 - F	1.350 ml./24 h.	715 mg./l. 965 mg./24 h.	24 mg./l. 32,5 mg./24 h.	20 mg./l. 27 mg./24 h.	O

ESSAI DU 12 NOVEMBRE 1955 :

Régime alimentaire commun

Petit Déjeuner : Lait, pain, beurre.

Déjeuner : Viande : Bifteck.

Légumes : Pommes de terre, chou, céleri,
salade (laitue).

Fromage : Camembert.

Fruits : Poires.

Boissons : Vin, thé.

Dîner : Œufs : Omelette.

Légumes : Salade (laitue).

Fromage : Camembert.

Fruits : Raisin.

RÉSULTATS

TABLEAU XIII

Sujet	Diurèse	Extrait sec désionisé	MESO-INOSITOL		Présence de scyllitol
			Neurospora	Chromatogra- phie	
N° 1 - M	1.050 ml./24 h.	760 mg./l. 800 mg./24 h.	25 mg./l. 26 mg./24 h.	40 mg./24 h. 42 mg./24 h.	+
n° 2 - F	800 ml./24 h.	1.145 mg./l. 915 mg./24 h.	40 mg./l. 32 mg./24 h.	50 mg./l.	O

b) INTERPRETATION DES RESULTATS

On remarque tout d'abord que tous les chiffres trouvés (taux d'extrait sec désionisé et de méso-inositol) sont de même ordre que ceux déjà inscrits dans le tableau IX, ce qui confirme les résultats antérieurs.

D'autre part, afin de rendre les résultats présents plus comparables entre eux, nous avons dressé pour les deux sujets examinés le graphique des éliminations successives de méso-inositol en ne tenant compte que des chiffres rapportés à 24 heures et déterminés par le test au *Neurospora*, plus précis que l'évaluation chromatographique (voir figure X ci-dessous).

L'examen de ce graphique permet de faire les constations suivantes :

1° Bien que l'élimination urinaire du méso-inositol ait présenté quelques différences entre les deux sujets soumis au même régime alimentaire, on constate que ces chiffres demeurent du même ordre et qu'il existe un certain parallélisme entre les éliminations de ces deux sujets déterminées à dates successives.

Il est donc permis de supposer que le régime alimentaire, par ses apports variables en méso-inositol pourrait avoir une certaine influence sur l'élimination urinaire de cette substance.

2° Toutefois cette influence, si elle existe ne se manifeste pas clairement, puisque pour des variations apparemment minimales du régime, l'élimination urinaire du méso-inositol a pu varier du simple au double.

En pratique il était impossible de connaître avec exactitude quelle quantité de méso-inositol (et même plus simplement d'inositol) était apportée par les aliments dans chaque épreuve. En effet, depuis les travaux de G. MEILLÈRE (37) publiés de 1906 à 1908, on sait que l'inositol est très répandu dans le règne végétal et qu'il a été en particulier caractérisé dans de nombreux aliments, ainsi :

— dans les légumes : chou-fleur, tomate, ail, oignon, échalotte, pois, haricots, asperges, légumes verts et salade en particulier, pomme de terre, carottes, radis, navet, salsifis ;

— dans les fruits : cerise, poire, pomme, raisin ;

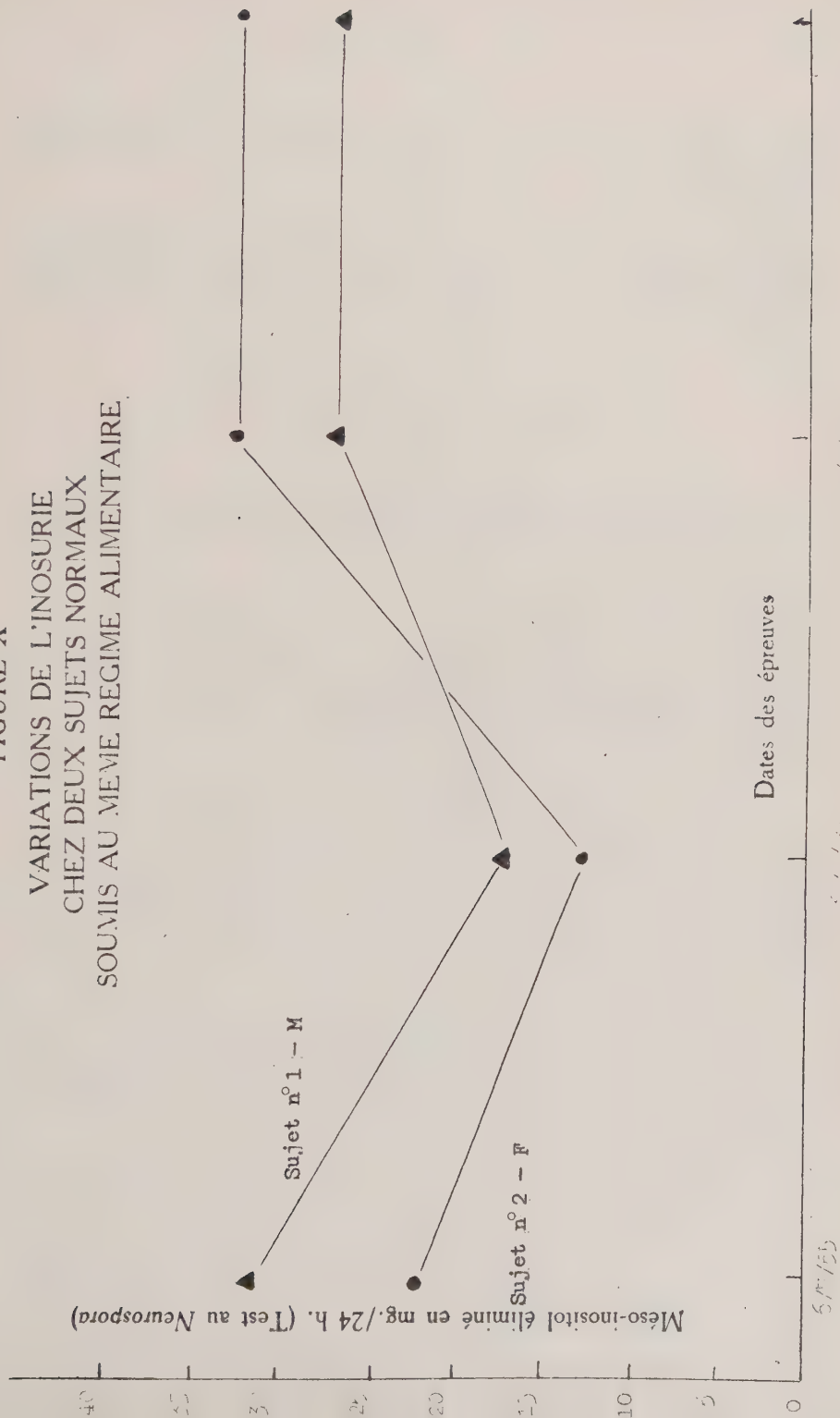
— dans les champignons

— et dans tous les vins.

De même les travaux de divers auteurs ont montré que l'inositol était très répandu dans le règne animal et qu'il se retrouvait en particulier dans les aliments suivants : muscles et divers organes animaux, cœur, foie, rein, cervelle, thyroïde, etc..., ainsi que dans le jaune d'œuf.

On sait donc bien que l'inositol existe, sous forme libre ou combinée, dans la plupart de nos aliments, mais (comme cela s'est produit pour l'urine)

FIGURE X
 VARIATIONS DE L'INOSURIE
 CHEZ DEUX SUJETS NORMAUX
 SOUMIS AU MEME REGIME ALIMENTAIRE



faute de techniques spécifiques les recherches antérieures n'ont pas encore déterminé en général s'il s'y trouvait sous forme de méso-inositol et dans quelles proportions.

Nous avons donc été amenés, en vue de mettre plus clairement en évidence une influence éventuelle des quantités de méso-inositol absorbées sur leur élimination urinaire, à reprendre les essais précédents en surchargeant le régime alimentaire par des quantités connues de méso-inositol pur.

c) DETERMINATION DE L'INOSURIE CHEZ UN NOURRISSON

Avant d'aborder cette dernière partie de notre travail, nous voudrions rapporter également, dans le cadre du présent chapitre, le seul dosage d'inosurie que nous ayons pu effectuer chez un nourrisson :

Il s'agissait d'un enfant de 2 mois 1/2, du sexe masculin, recevant exclusivement 780 g. par jour de lait de vache demi-écrémé (lait GUIGOZ).

Nous avons pratiqué l'extraction selon notre technique sur un échantillon moyen de 80 ml. d'urines recueillies au cours de 24 heures consécutives. Nous avons obtenu les résultats suivants :

Extrait sec désionisé : 300 mg. par litre.

— Méso-inositol par chromatographie : 19 mg. par litre.

— Méso-inositol par *Neurospora* : 17,5 mg. par litre.

L'élimination par 24 heures n'a pas été calculée, car nous n'avons pu recueillir la totalité des urines émises pendant ce temps. Mais on peut constater que les taux de méso-inositol par litre d'urine sont de même ordre que ceux déjà trouvés chez l'adulte (voir tableau IX).

Il est dommage que nous n'ayons pu disposer d'urines d'autres nourrissons pour renouveler cette détermination, car on ne saurait tirer de conclusions sérieuses d'un cas isolé et cependant intéressant. Tout au plus nous est-il permis de supposer que l'allaitement artificiel classique est susceptible de couvrir les besoins du nourrisson en méso-inositol.

CHAPITRE III

ESSAIS DIVERS DE SURCHARGE DE L'ORGANISME EN MESO-INOSITOL

1° ETUDE DE L'INOSURIE APRES LA SURCHARGE EN INOSITOL

Nous avons effectué une nouvelle série d'essais en mesurant comme précédemment l'élimination urinaire pendant 24 heures du méso-inositol chez les deux mêmes sujets. Ces sujets ont été soumis la veille de chaque essai à un régime connu et identique, mais comportant plusieurs fois des surcharges de 1 et 2 grammes de méso-inositol pur, et une fois une surcharge de 2 grammes du sel calcique de l'ester hexa-mono-ortho-phosphorique du méso-inositol, en l'occurrence de la Phytine CIBA.

Nous reproduisons ci-dessous le détail des régimes suivis et les résultats que nous avons obtenus après ces épreuves (*tableaux XIV à XX*).

a) OBSERVATIONS

ESSAI DU 16 NOVEMBRE 1955 :

Régime alimentaire commun

Petit Déjeuner : Lait, pain, beurre + 1 g. de méso-inositol.

Déjeuner : Viande : Bifteck.

Légumes : Pommes de terre, chou, céleri,
salade (laitue).

Fromage : Camembert.

Fruits : Pommes.

Boisson : Vin, thé.

Dîner : Œufs : Omelette.

Légumes : Salade (laitue).

Fruits : Camembert.

Fromage : Raisin.

RÉSULTATS

TABLEAU XIV

Sujet	Diurèse	Extrait sec désionisé	MESO-INOSITOL		Présence de scyllitol
			Neurospora	Chromatogra- phie	
n° 1 - M	900 ml./24 h.	980 mg./l. 882 mg./24 h.	24 mg./l. 21,5 mg./24 h.	30 mg./l. 27 mg./24 h.	O
n° 2 - F	900 ml./24 h.	960 mg./l. 864 mg./24 h.	24 mg./l. 21,5 mg./24 h.	40 mg./l. 36 mg./24 h.	O

ESSAI DU 22 NOVEMBRE 1955 :

Régime alimentaire commun

Petit Déjeuner : Lait, pain, beurre + 2 g. méso-inositol.

Déjeuner : Viande : Bifteck.

Légumes : Pommes de terre, chou, céleri,
salade (laitue).

Fromage : Camembert.

Fruits : Pommes.

Boissons : Vin, thé.

Dîner : Œufs : Omelette.

Légumes : Salade (laitue).

Fromage : Camembert.

Fruits : Poires.

RÉSULTATS

TABLEAU XV

Sujet	Diurèse	Extrait sec désionisé	MESO-IN OSITOL		Présence de scyllitol
			Neurospora	Chromatogra- phie	
n° 1 - M	800 ml./24 h.	1.140 mg./l. 912 mg./24 h.	26 mg./l. 21 mg./24 h.	26 mg./l. 21 mg./24 h.	+
n° 2 - F	1.070 ml./24 h.	930 mg./l. 995 mg./24 h.	20 mg./l. 21,5 mg./24 h.	36 mg./l. 38 mg./24 h.	O

ESSAI DU 3 FÉVRIER 1956 :

Régime alimentaire commun

Petit Déjeuner : Thé, pain, beurre + 2 g. méso-inositol.

Déjeuner : Viande : Côtelette de porc.
Légumes : Purée de marrons, salade.
Fromage : Camembert.
Fruits : en confitures.
Boissons : Vin, thé.

Dîner : Viande : Jambon.
Légumes : Pommes de terre, salade.
Fromage : Camembert.
Fruits : en confitures.

RÉSULTATS

TABLEAU XVI

Sujet	Diurèse	Extrait sec désionisé	MESO-INOSITOL		Présence de scyllitol
			Neurospora	Chromatogra- phie	
n° 1 - M	920 ml./24 h.	660 mg./l. 625 mg./24 h.	23 mg./l. 21 mg./24 h.	27 mg./l. 24,5 mg./24 h.	+
n° 2 - F	1.000 ml./24 h.	790 mg./l. 790 mg./24 h.	15 mg./l. 15 mg./24 h.	38 mg./l. 38 mg./24 h.	+

ESSAI DU 17 AVRIL 1956 :

Régime alimentaire commun

Petit Déjeuner : Thé, pain beurre (sans surcharge d'inositol).

Déjeuner : Viande : Côte d'agneau.
Légumes : Lentilles, salade.
Fromage : Camembert.
Fruits : Banane.

Dîner : Viande : Vin, thé.
Boissons : Porc fumé.
Légumes : Lentilles, salade.
Fromage : Camembert.
Fruits : Pommes.

RÉSULTATS

TABLEAU XVII

Sujet	Diurèse	Extrait sec désionisé	MESO-INOSITOL		Présence de scyllitol
			Neurosopra	Chromatogra- phie	
n° 1 - M	1.000 ml./24 h.	810 mg./l. 810 mg./24 h.	10 mg./l. 10 mg./24 h.	15 mg./l. 15 mg./24 h.	O
n° 2 - F	800 ml./24 h.	940 mg./l. 742 mg./24 h.	33 mg./l. 27 mg./24 h.	45 mg./l. 36 mg./24 h.	O

ESSAI DU 24 AVRIL 1956 :

Régime alimentaire commun

Petit Déjeuner : Thé, pain, beurre + 2 g. méso-inositol.

Déjeuner : Viande : Côte d'agneau.
Légumes : Lentilles, salade.
Fromage : Camembert.
Fruits : Banane.
Boisson : Vin, thé.

Dîner : Viande : Jambon.
Légumes : Lentilles, salade.
Fromage : Camembert.
Fruits : Pommes.

RÉSULTATS

TABLEAU XVIII

Sujet	Diurèse	Extrait sec désionisé	MESO-INOSITOL		Présence de scyllitol
			Neurospora	Chromatogra- phie	
n° 1 - M	1.000 ml./24 h.	900 mg./l. 900 mg./24 h.	30 mg./l. 30 mg./24 h.	34 mg./l. 34 mg./24 h.	+
n° 2 - F	900 ml./24 h.	1.070 mg./l. 963 mg./24 h.	30 mg.-/l. 27 mg./24 h.	40 mg./l. 36 mg./24 h.	+

ESSAI DU 28 AVRIL 1956 :

Régime alimentaire commun

Petit Déjeuner : Thé, pain, beurre (sans surcharge de méso-inositol).

Déjeuner : Viande : Côte de veau.

Légumes : Epinards, riz.

Fromage : Camembert.

Fruits : Banane.

Boissons : Vin, thé.

Dîner : Viande : Jambon.

Légumes : Epinard, salade, radis.

Fromage : Camembert.

Fruits : Banane.

RÉSULTATS

TABLEAU XIX

Sujet	Diurèse	Extrait sec désionisé	MESO-INOSITOL		Présence de scyllitol
			Neurospora	Chromatogra- phie	
n° 1 - M	925 ml./24 h.	820 mg./l. 760 mg./24 h.	20 mg./l. 18,5 mg./24 h.	27 mg./l. 25 mg./24 h.	+
n° 2 - F	975 ml./24 h.	565 mg./l. 550 mg./24 h.	30 mg./l. 29 mg./24 h.	32 mg./l. 31 mg./24 h.	+

ESSAI DU 4 MAI 1956 :

Régime alimentaire commun

Petit Déjeuner : Thé, pain, beurre + 2 g. Phytine Ciba.

Déjeuner : Viande : Côte de veau.

Légumes : Epinards, riz.

Fromage : Camembert.

Fruits : Banane.

Boissons : Vin, thé.

Dîner : Viande : Jambon.

Légumes : Epinards, salade.

Fromage : Camembert.

Fruits : Banane.

RÉSULTATS

TABLEAU XX

Sujet	Diurèse	Extrait sec désionisé	MESO-INOSITOL		Présence de scyllitol
			Neurospora	Chromatogra- phie	
n° 1 - M	850 ml./24 h.	1.075 mg./l. 915 mg./24 h.	26 mg./l. 22 mg./24 h.	15 mg./l. 13 mg./24 h.	+
n° 2 - F	820 mg./24 h.	985 mg./l. 807 mg./24 h.	25 mg./l. 20,5 mg./24 h.	22 mg./l. 18 mg./24 h.	+

b) INTERPRETATION DES RESULTATS

Comme précédemment, pour rendre les résultats plus comparables entre-eux, nous avons établi le graphique reproduisant pour chaque épreuve l'inosurie observée (en ne tenant compte que des quantités de méso-inositol éliminées en 24 heures et mesurées par le *Neurospora*) et en indiquant les surcharges en inositol ou en Phytine (voir figure n° XI).

On peut constater ainsi que chez les deux sujets examinés les chiffres d'inosurie furent toujours de même ordre, et souvent assez voisins, et que les chiffres les plus voisins ont été observés dans les épreuves qui comportaient une surcharge en inositol.

Par contre, nous remarquons que si l'inosurie a varié légèrement d'une épreuve à l'autre, mais seulement dans les limites des variations physiologiques déjà observées auparavant, les surcharges importantes de l et même 2 grammes de méso-inositol dans le régime n'ont pas fait apparaître la moindre décharge urinaire correspondante de méso-inositol.

Tout se passe donc comme si le méso-inositol contenu naturellement dans les aliments, ou ajoutés à ceux-ci, se trouvait en majeure partie métabolisé dans l'organisme.

Nous avons alors pensé que le méso-inositol pouvait être facilement oxydé en inosose dans l'organisme, par action enzymatique, sous l'effet d'une deshydrogénase. Cet inosose a été en effet obtenu par voie biochimique pour la première fois en 1930 par A.-J. KLUYVER et A.G.-J. BOEZAART (27) en faisant agir l'*Acetobacter suboxydans* sur le méso-inositol. Th. POSTERNAK l'a désigné sous le nom de scyllo-méso-inosose, parce que son hydrogénation produit du méso-inositol et du scyllitol, par opposition à son isomère obtenu par voie chimique, l'épi-méso-inosose qui donne par hydrogénation du méso-inositol et de l'épi-inositol.

Le scyllo-méso-inosose (comme d'ailleurs son isomère) possède des propriétés réductrices importantes : il réduit instantanément la liqueur de FEHLING, même à froid. D'autre part il donne, comme l'inositol, une intense réaction de SCHERER-GALLOIS. W.-H. SCHOPFER (50) a par ailleurs constaté que les inososes sont encore plus répandus dans la nature que les inositols.

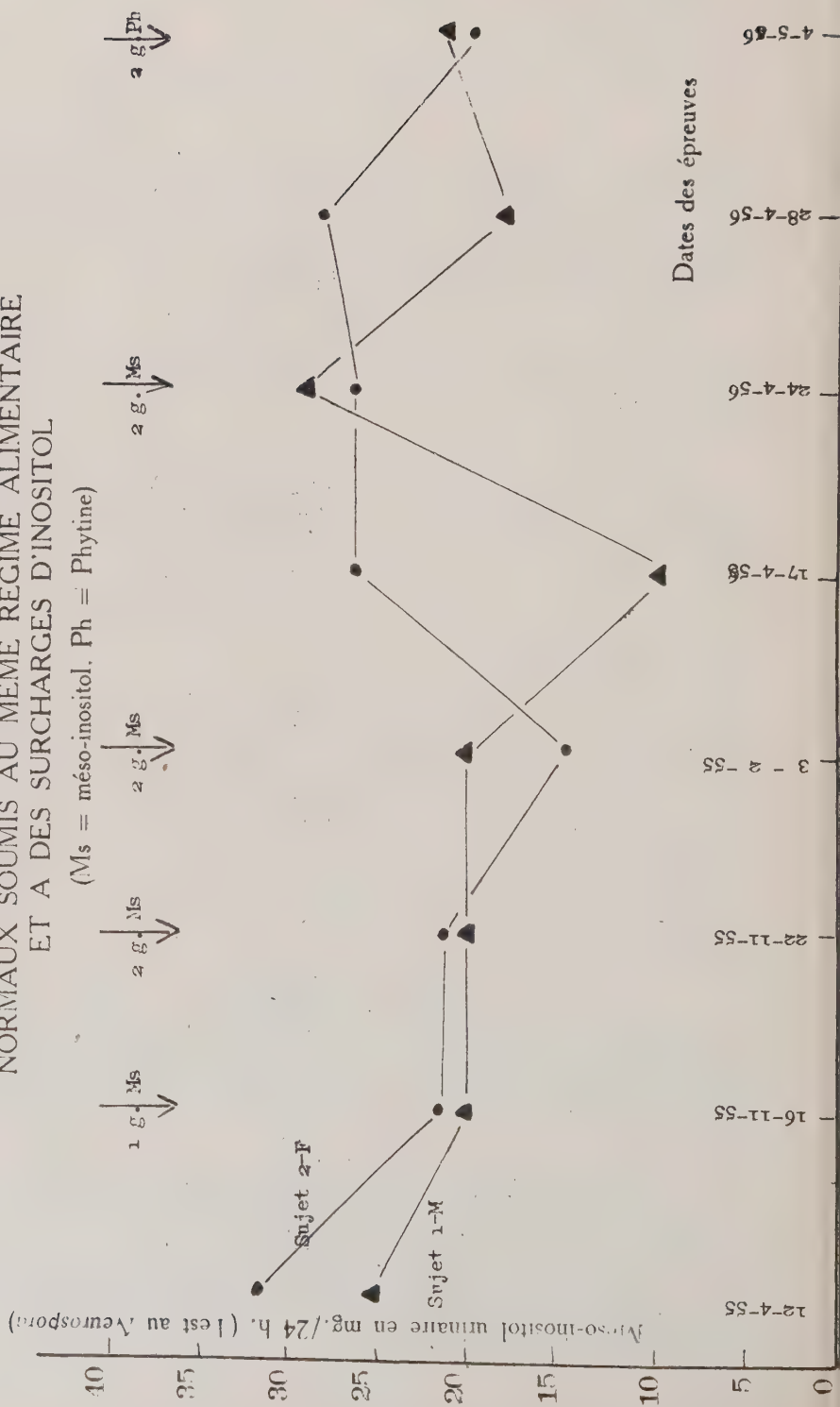
Nous avons donc pensé que la majeure partie de l'inositol absorbé avec les aliments, et non retrouvée avec nos méthodes de dosage, pouvait avoir été éliminée par les urines sous forme d'inosose.

En effet, comme l'a montré W.-H. SCHOPFER (51) le *Neurospora crassa* ne réagit aucunement avec le scyllo-méso-inosose. D'autre part nous

FIGURE XI

VARIATIONS DE L'INOSURIE CHEZ DEUX SUJETS
NORMAUX SOUMIS AU MEME REGIME ALIMENTAIRE
ET A DES SURCHARGES D'INOSITOL

(Ms = méso-inositol, Ph = Phytine)



n'avons jamais observé sur nos chromatogrammes de taches autres que celles correspondant au scyllitol et au méso-inositol. Mais cette constatation ne suffisait pas à éliminer l'hypothèse de la présence d'inosose dans les urines examinées, car cette substance à fonction cétonique qui peut agir sous la forme émol pouvait avoir été retenue par l'échangeur d'anions (Déacidite) lors de la préparation de nos extraits urinaires.

Nous avons donc recherché directement sur les urines, avant toute extraction, si l'absorption d'inositol, éventuellement éliminé sous forme d'inosose à fortes propriétés réductrices, entraînait une augmentation du pouvoir réducteur urinaire normalement assez faible.

2. MESURES DU POUVOIR REDUCTEUR URINAIRE AVANT ET APRES ABSORPTION D'INOSITOL

Pour nos déterminations du pouvoir réducteur urinaire, nous avons adapté à l'urine la technique colorimétrique, basée sur l'emploi du réactif cupro-alcalin, qui fut proposée par FOLIN et WU (23) pour le dosage de la glycémie.

Nous avons choisi cette méthode, malgré sa marge d'imprécision (d'ailleurs commune à toutes les mesures colorimétriques) parce qu'elle était plus commode et surtout beaucoup plus spécifique que la méthode à l'iodomercurate de BAUDOUIN. Cette dernière ne pouvait convenir, car l'iodomercurate alcalin moins sélectif, pouvait être réduit par des composés non glucidiques de l'urine, tel l'acide β -hydroxybutyrique par exemple.

Voici donc l'essentiel de la technique que nous avons appliquée à l'urine après défécation au réactif de Courtonne :

a) TECHNIQUE

Réactifs :

Ce sont les réactifs classiques suivants qui figurent dans tous les ouvrages courants de Laboratoire, et dont nous nous dispensons de donner la formule :

- Réactif de Courtonne.
- Sulfate de sodium anhydre.
- Liqueur cupro-alcaline.
- Réactif phospho-tungsto-molybdique.
- Solution stock de glucose pur à 1 pour 100, à diluer pour l'emploi :

Pratiquement on dilue au 1/50^e pour obtenir une solution étalon à 0,2 pour 1.000, dont 1 ml. = 0,2 mg. de glucose.

Défécation de l'urine :

Dans une fiole jaugée de 100 ml., mesurer : urine, 50 ml. exactement + réactif de Courtonne, 5 ml. Agiter et laisser reposer. Ajouter

environ 2 g. de sulfate de sodium et compléter à 100 ml. avec de l'eau distillée. Boucher, agiter, laisser reposer et filtrer.

On obtient ainsi un filtrat urinaire au 1/2.

Dosage :

Disposer dans 3 tubes spéciaux de FOLIN et WU les réactifs de la façon indiquée dans le tableau suivant (voir *tableau XXI*).

TABLEAU XXI

MESURE DU POUVOIR REDUCTEUR URINAIRE.

RÉACTIFS	Tube n° 1 (Dosage)	Tube n° 2 (Témoin)	Tube n° 3 (Témoin)
Filtrat urine 1/2	0,5 ml.	0	0
Eau distillée	1,5 ml.	1 ml.	0
Solution glucose 0,2 p. 1.000	0	1 ml.	2 ml.
soit glucose =	(x)	(0,2 mg.)	(0,4 mg.)
Porter 7 à 8 minutes au bain-marie bouillant refroidir et ajouter :			
Réactif phospho-tungsto-mol.	2 ml.	2 ml.	2 ml.
Attendre 1 minute, puis ajouter :			
Eau distillée q.s.p.	25 ml.	25 ml.	25 ml.
Agiter et comparer au colorimètre la coloration bleue obtenue dans le tube n° 1 (dosage) avec celle du témoin le plus proche.			

Calculs :

Si l'on a utilisé 0,5 ml. de filtrat urinaire au 1/2 (soit 1/4 ml. d'urine initiale) le chiffre du pouvoir réducteur urinaire, exprimé arbitrairement en mg. de glucose par litre, est donné par la formule :

$$0,2 \text{ m. (ou } 0,4 \text{ mg.)} \times \frac{\text{hauteur tube témoin}}{\text{hauteur tube dosage}} \times 4 \times 1.000$$

Chiffres normaux :

D'après divers auteurs le pouvoir réducteur des urines normales, exprimé en glucose varie de 0,25 à 1,50 g. par litre environ selon les individus, le régime alimentaire, les heures de la journée et les méthodes de dosage utilisées.

b) ESSAIS PERSONNELS

Au cours d'essais préliminaires, nous avons trouvé personnellement avec la technique décrite ci-dessus des chiffres analogues sur des urines normales. Nous avons réuni ces résultats dans le tableau n° XXII.

TABLEAU XXII

**POUVOIRS REDUCTEURS (exprimés en Glucose) d'URINES DE
SUJETS PRESUMES NORMAUX**

DOSAGES PAR LA METHODE DE FOLIN ET WU

Essai n°	Echantillon	Pouvoir réducteur exprimé en glucose	
		par litre	par 24 heures
1	Urines du matin	0,80 g.	—
2	id.	1,06 g.	—
3	id.	1,46 g.	—
4	Urines des 24 h.	1,20 g.	1,14
5	id.	1,50 g.	1,12
6	id.	1,50 g.	1,27
7	id.	1,86 g.	1,50

Nous exprimons le pouvoir réducteur en glucose, comme il est de tradition pour un mélange complexe d'oses réducteurs. En réalité, les oses de l'urine normale sont, à côté du glucose : l'arabinose et le xylose provenant de certains aliments végétaux, le ribulose et le xylocétose, et des holosides à galactose, fucose et glucosamine.

D'autre part, chez deux sujets en bonne santé apparente, et soumis à un régime alimentaire normalement équilibré, nous avons recueilli les urines de 24 heures, mesuré leur volume et déterminé leur pouvoir réducteur.

Dans les 24 heures suivantes le même régime a été additionné de 2 g. de méso-inositol et nous avons de même recueilli les urines en mesurant leur volume et en déterminant leur pouvoir réducteur. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau n° XXIII.

TABLEAU XXIII

POUVOIRS REDUCTEURS (exprimés en Glucose) D'URINES NORMALES AVANT ET APRES ABSORPTION DE 2 G. DE MESO-INOSITOL PUR

Sujet	Urines des 24 h.	Diurèse	Pouvoir réducteur (en glucose)
n° 1 - M	Avant l'épreuve	850 ml./24 h.	1,27 g./24 h.
	Après ingestion de 2 g. de méso-inositol	920 ml./24 h.	1,28 g./24 h.
n° 2 - F	Avant l'épreuve	800 ml./24 h.	1,50 g./24 h.
	Après ingestion de 2 gr. de méso-inositol	1.000 ml./24 h.	1,35 g./24 h.

On constate que dans les deux cas la surcharge du régime alimentaire par 2 g. de méso-inositol n'a provoqué aucune augmentation du pouvoir réducteur urinaire apprécié par la liqueur cupro-alcaline. Cette constatation semblant écarter l'hypothèse d'une élimination du méso-inositol sous forme d'inosose normalement décelable par ses propriétés réductrices, nous avons alors pensé que le méso-inositol pouvait être comburé dans l'organisme comme un glucide, ce qui nous a amenés à effectuer de nouveaux essais.

3° ESSAIS AVEC SURCHARGES ALIMENTAIRES COMBINÉES DE GLUCOSE ET D'INOSITOL PURS

De nouveaux essais ont été effectués en faisant absorber à nos deux sujets une forte dose de méso-inositol pur associée à une très forte dose de glucose. Nous pensions en effet que si l'inositol se trouvait comburé dans l'organisme comme un glucide, il entrerait alors en compétition avec ceux de la nourriture et que, dans le cas présent, l'association d'une très forte dose de glucose pouvait favoriser l'élimination de l'inositol dans l'urine soit sous forme naturelle, soit sous forme d'inosose.

Ces essais ont été pratiqués dans les conditions suivantes :

Chez les deux sujets précédents, en bonne santé apparente et soumis à un régime alimentaire normal, nous avons recueilli les urines de 24 heures et mesuré leur volume et leur pouvoir réducteur. Le lendemain matin, vers 8 heures, à jeun, chaque sujet a absorbé avec une tasse de thé un mélange de :

Méso-inositol pur	4 gr.
Glucose pur	100 g.

Aussitôt après nous avons recueilli leurs urines en deux fractions :

- Fraction 1 = urines des 3 premières heures
(soit de 8 à 11 heures).
- Fraction 2 = urines des 3 heures suivantes
(soit de 11 à 14 heures).

Pour chaque fraction nous avons mesuré :

- le volume d'urines émis,
- le pouvoir réducteur sur le réactif cupro-alcalin,
- la quantité de méso-inositol éliminé.

Les résultats ont été réunis dans le tableau n° XXIV.

Il apparaît nettement que, malgré la surcharge massive en glucose et en inositol, le pouvoir réducteur des urines n'a pas été augmenté. Nous avons même trouvé des pouvoirs réducteurs inférieurs à ceux déterminés sur les urines des 24 heures précédentes, ceci peut-être parce que ces sujets étaient à jeun, ou du moins n'avaient pas absorbé autre chose que les substances d'épreuves.

TABLEAU XXIV

ETUDE DU POUVOIR REDUCTEUR URINAIRE ET DE L'INOSURIE
APRES EPREUVE DE SURCHARGE EN MESO-INOSITOL (4 g.) ET EN GLUCOSE (100 g.)

	Echantillon d'urines	Volume émis	Pouvoir réducteur (en glucose))	Méso-inositol éliminé (*)	Présence de scyllitol
n° 1 - M	Urines des 24 h. avant l'épreuve	750 ml./24 h.	1,50 g./l.	/	/
	Urines après épreuve Fraction 1 (8 h. à 11 h.)	170 ml./ 3 h.	0,136 g. Soit : 0,80 g./l.	2,8 mg. Soit : 16,5 mg./l.	+
	Urines après épreuve Fraction 2 (11 h. à 14 h.)	375 ml./ 3 h.	0,158 g. Soit : 0,42 g./l.	9,4 mg. Soit : 25 mg./l.	+
n° 2 - F	Urines des 24 h. avant l'épreuve	950 ml./24 h.	1,20 g./l.	/	/
	Urines après épreuve Fraction 1 (8 h. à 11 h.)	240 ml./ 3 h.	0,149 g. Soit : 0,61 g./l.	6 mg. Soit : 25 mg./l.	+
	Urines après épreuve Fraction 2 (11 h. à 14 h.)	200 ml./ 3 h.	0,160 g. Soit : 0,80 g./l.	10 mg. Soit : 50 mg./l.	+

(*) Chiffres déterminés par le test au **Neurospora** et confirmés par évaluation chromatographique.

On peut donc conclure de cet essai, que le pouvoir glycopexique normal du foie de ces deux sujets ne s'est pas trouvé débordé par la surcharge glucidique, et que d'autre part cette importante surcharge glucidique n'a pas favorisé l'élimination de l'inositol, sous forme d'inosose.

Enfin, les mesures de l'inosurie dans les diverses fractions recueillies après l'épreuve ont montré que malgré la surcharge massive ingérée, les quantités de méso-inositol éliminées dans l'urine (et ramenées au litre) étaient tout à fait du même ordre que celles déterminées antérieurement sur ces mêmes sujets soumis à un régime normal.

Par conséquent une ingestion massive de méso-inositol (4 grammes), bien supérieure aux quantités apportées par le régime alimentaire normal, et même associée à une forte dose de glucose (100 g.) n'est pas susceptible de provoquer une augmentation de l'élimination urinaire normale du méso-inositol.

On n'observe donc pas avec le méso-inositol de phénomène de clearance comme cela se produit avec un hexitol acylique, le mannitol, couramment utilisé en biologie clinique pour étudier la filtration glomérulaire.

Toutes ces observations semblent démontrer que le méso-inositol (constituant normal de la plupart des cellules animales et végétales) même absorbé à doses assez importantes, est rapidement résorbé et métabolisé dans l'organisme, probablement suivant un processus complexe encore mal connu.

4° ETUDE DE LA SCYLLITOLURIE

Après avoir reconnu que des surcharges importantes de méso-inositol n'entraînaient aucune augmentation de l'élimination urinaire de cette substance ni sous sa forme primitive, ni sous forme d'inosose résultant d'un processus d'oxydation biologique, notre attention s'est portée sur les éliminations urinaires de scyllitol.

On sait que cette substance peut prendre naissance (concurrentement avec le méso-inositol) par hydrogénation du scyllo-méso-inosose.

Les recherches de M.-P. MALANGEAU (32) récemment confirmées par celles de J. MONTREUIL (38) ont déjà montré que si le méso-inositol est présent dans toutes les urines, par contre son isomère le scyllitol ne s'y retrouve que par intermittence (au moins aux doses limites décelables par la méthode chromatographique que nous avons nous-mêmes utilisée).

On n'a pas encore déterminé quelles étaient les conditions d'apparition du scyllitol dans les urines. Celle-ci n'est influencée en particulier ni par le sexe des sujets examinés, ni par les variations saisonnières du régime alimentaire.

Nous avons alors pensé à comparer la fréquence de l'apparition de la scyllitolurie en fonction de nos épreuves de surcharge en méso-inositol qui introduisaient dans l'organisme des quantités de cette substance bien supérieures à celles apportées par un régime normal. Les résultats de cette étude sont rapportés dans le tableau n° XXV.

TABLEAU XXV

INFLUENCE DES SURCHARGES DU REGIME ALIMENTAIRE
EN MESO-INOSITOL
SUR L'APPARITION DE LA SCYLLITOLURIE

1° Sujets au régime normal			
SURCHARGE	Nombre de cas examinés	NOMBRE D'URINES	
		Avec scyllitol	Sans scyllitol
Nulle	Total = 21 cas	5	16
2° Sujets au régime normal avec surcharge d'inositol			
SURCHARGE	Nombre de cas examinés	NOMBRE D'URINES	
		Avec scyllitol	Sans scyllitol
1 g. méso-inositol	2	0	2
2 g. méso-inositol	6	5	1
4 g. méso-inositol + 100 g. glucose	2	2	0
2 g. inosito-phos- phate	2	2	0
	Total = 12 cas	9	3

Au total, chez 21 sujets en bonne santé apparente et soumis à un régime alimentaire normal, nous n'avons relevé que 5 cas de scyllitolurie décelables par la méthode chromatographie.

Par contre, chez 12 sujets absorbant des surcharges de 1 à 4 grammes de méso-inositol (ou même de Phytine), nous avons observé, avec la même méthode, 9 cas de scyllitolurie, proportion beaucoup plus élevée.

DISCUSSION DES RESULTATS

Malgré le nombre limité de cas que nous avons pu observer il semble bien qu'il y ait une nette corrélation entre la fréquence d'apparition de la scyllitolurie et les surcharges alimentaires en méso-inositol (au moins pour les doses dépassant 1 gramme).

Il est donc permis d'envisager que le scyllitol urinaire pourrait dériver du métabolisme du méso-inositol. En effet, les quantités de méso-inositol que nous avons toujours décelées dans l'urine (et qui d'après nos déterminations avec le *Neurospora* sont de l'ordre de 30 mg. par litre), ne représentent qu'une fraction minime des apports alimentaires, puisque même l'absorption de doses importantes de méso-inositol (1 à 4 grammes) n'a pas augmenté cette élimination.

La majeure partie du méso-inositol d'origine alimentaire semble donc rapidement résorbée et métabolisée dans l'organisme. Il est possible en particulier qu'il soit transformé en scyllo-méso-inosose par action enzymatique réversible sous l'effet d'une deshydrogénase. Toutefois, le méso-inositol ne semble pas éliminé sous cette forme dans les urines, comme le confirment nos recherches sur les variations du pouvoir réducteur.

Par contre, l'apparition du scyllitol dans les urines, irrégulière, mais en rapport avec les surcharges du régime en méso-inositol, nous ayant suggéré qu'il dérivait peut-être de cette substance, nous avons pensé que le métabolisme du méso-inositol pouvait comporter les phases suivantes :

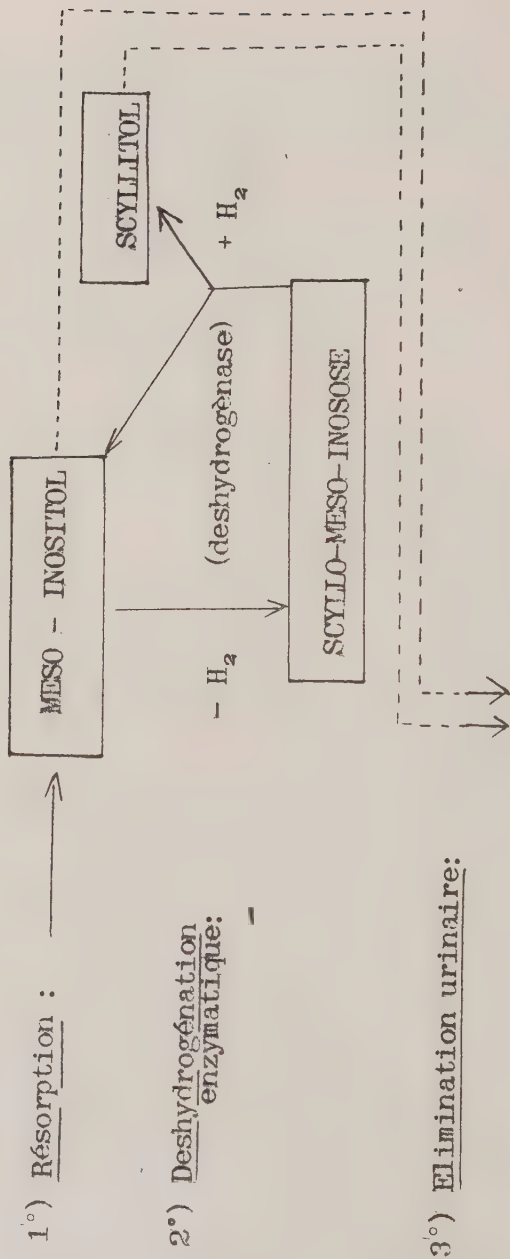
Le méso-inositol pourrait être, après résorption, transformé en scyllo-méso-inosose par deshydrogénation enzymatique sous l'effet d'une deshydrogénase.

Cette action, réversible, conduirait à une réduction de l'inosose produisant du méso-inositol et du scyllitol, substances conjointement, et sans doute partiellement, éliminées dans les urines.

Le schéma que nous reproduisons ci-contre (*figure XII*) résume ainsi les hypothèses que nous venons de proposer pour expliquer une partie de métabolisme certainement complexe et encore mal connu du méso-inositol.

FIGURE XII

SCHEMA PARTIEL DU METABOLISME DU MESO-INOSITOL
(HYPOTHESE PROPOSEE)



RESUME ET CONCLUSIONS

Nous avons cherché à déterminer par des techniques chimiques et microbiologiques assez spécifiques l'inosurie physiologique chez l'Homme. Ce problème qui avait déjà fait l'objet de nombreuses recherches depuis un siècle n'avait pas encore reçu de solution pratique satisfaisante, faute de techniques sûres et sélectives.

L'apparition de nouvelles méthodes d'analyse, telles que la chromatographie sur papier et l'utilisation des résines échangeuses d'ions, nous a permis d'aborder à notre tour ce problème dans de meilleures conditions.

Avant de procéder à l'extraction des cyclitols urinaires, nous avons dans une première partie de notre travail étudié diverses méthodes de dosage de l'inositol pur en solution aqueuse. Nous avons retenu comme méthode de référence le dosage volumétrique par l'acide periodique, qui est très précis et ne présente aucune difficulté.

Pour nos recherches nous avons retenu d'autre part comme deuxième méthode de dosage le test au *Neurospora crassa* préconisé par W.-H. SCHOPFER. Cette méthode microbiologique très spécifique permet de doser avec une précision suffisante de très faibles doses de méso-inositol (de l'ordre de quelques micro-grammes). Mais sa pratique s'avère assez délicate, et nous en avons effectué d'abord une étude critique systématique dans le but de rechercher quelles pouvaient être les causes des perturbations parfois observées. Nous avons ainsi précisé les meilleures conditions permettant d'effectuer un dosage correct du méso-inositol au moyen du *Neurospora*; préparation de la verrerie et des milieux de culture, température optimum, etc...

Cette étude a montré d'autre part que les causes essentielles de perturbations éventuelles du dosage microbiologique, probablement intrinsèques, n'étaient cependant en rapports ni avec l'âge des souches de *Neurospora*, ni avec la richesse en spores desensemencements. Si l'instabilité du mutant « inositolless » utilisé a pu être parfois invoquée, il demeure quelques cas où nous n'avons pu déterminer quelle était la cause essentielle d'une croissance irrégulière du *Neurospora*.

Cependant, en règle générale, ce test donne des résultats satisfaisants, si l'on n'hésite pas éventuellement à changer de souche ou à recommencer tout dosage microbiologique d'apparence irrégulière.

Pour la séparation qualitative des cyclitols isomères (méso-inositol et scyllitol) nous avons utilisé la méthode de chromatographie sur papier, mise au point par M. P. MALANGEAU. Cette méthode ne présente guère de difficultés et donne de bons résultats. Elle se prête même à une évaluation quantitative approximative du méso-inositol.

Pour appliquer ces diverses méthodes d'analyse à une étude quantita-

tive de l'inosurie, nous nous sommes préoccupés de préparer des extraits urinaires purifiés contenant la totalité des inositols. Nous avons eu recours ainsi à l'utilisation des résines échangeuses d'ions. La deuxième partie de notre travail a été consacrée à la mise au point d'une technique d'extraction fournissant des rendements satisfaisants (de l'ordre de 95 pour 100). Cette étude nous a conduit à modifier certains détails techniques du mode opératoire proposé antérieurement par M. P. MALANGEAU, qui purifiait l'urine par simple passage sur une résine échangeuse de cations (Permutite) puis sur une résine échangeuse d'anions (Déacidite). Après maints essais il nous est apparu que la neutralisation par un léger excès d'ammoniaque des liqueurs acides provenant du traitement par la Permutite, et un lavage des colonnes de Déacidite avec une plus grande quantité d'eau distillée, permettaient d'extraire la quasi totalité de l'inositol urinaire. Les pertes en inositol variant de 15 à 30 pour 100 avec la technique originale ont été réduites de la sorte à un taux acceptable, voisin de 5 pour 100.

Le protocole opératoire que nous avons ainsi mis au point pour l'étude de l'inosurie a été décrit en détails et comporte les principales phases suivantes :

— L'urine est traitée par les résines échangeuses d'ions, et l'extrait désionisé est divisé en deux parties :

— Une première partie de cet extrait est soumise à la chromatographie sur papier qui permet une première évaluation approximative du méso-inositol, ainsi que son identification et la séparation de son isomère le scylitol, éventuellement présent.

— Une deuxième partie de l'extrait urinaire est utilisée pour le dosage microbiologique du méso-inositol au moyen du *Neurospora*.

L'ensemble de ces manipulations, longues et délicates, requiert pour une seule urine un temps considérable, mais nous avons préféré limiter le nombre de nos dosages et ne fournir que des résultats sûrs, obtenus par deux méthodes spécifiques se contrôlant mutuellement.

Nous avons pu alors aborder avec ces méthodes l'étude de l'inosurie physiologique chez l'homme, qui a constitué la troisième partie de notre travail.

Nos premières déterminations ont été effectuées sur les urines d'un groupe de sujets normaux des deux sexes et d'âges divers (3 mois à 70 ans). Elles ont fourni les résultats suivants :

— Taux d'extrait sec désionisé : 207 à 1.007 mg. par litre.
(moyenne : 521 mg./l.).

— Taux de méso-inositol : par le test au *Neurospora*, 12 à 56 mg. par litre (moyenne : 27 mg./l.);
par chromatographie : 15 à 72 mg. par litre (moyenne : 27 mg./l.).

Il convient de remarquer que les deux méthodes ont conduit dans l'ensemble à des résultats assez concordants.

Le seul dosage que nous ayons pu effectuer sur les urines d'un nourrisson de 3 mois (au régime lacté exclusif) nous a permis d'observer des taux d'inosurie du même ordre que chez l'adulte.

Nous avons ensuite étudié les variations de l'inosurie chez deux sujets en bonne santé apparente et soumis au même régime alimentaire, en chiffrant l'élimination par 24 heures. Les variations physiologiques de l'inosurie que nous avons ainsi observées ne nous ont pas semblée en rapport étroit avec les variations du régime alimentaire susceptibles de modifier la dose d'inositol ingéré.

Nous avons alors repris ses essais en ajoutant aux régimes des surcharges connues (de 1 à 4 grammes) de méso-inositol ou d'inosito-phosphate. Mais ces surcharges, relativement importantes, n'ont pas modifié de façon plus sensible l'élimination urinaire du méso-inositol. On n'observe donc pas avec l'inositol de phénomène de clarence comme cela se produit avec d'autres hexitols comme le mannitol, et il semble bien que la majeure partie de l'inositol ingéré soit métabolisée dans l'organisme.

Il est possible que l'un des stades de ce métabolisme soit constitué par la transformation de l'inositol en scyllo-méso-inosose résultant d'une deshydrogénation enzymatique. Toutefois l'inositol ne doit pas être éliminé dans les urines sous cette forme, car après les mêmes épreuves de surcharge nous n'avons pas davantage mis en évidence une augmentation du pouvoir réducteur urinaire sur le réactif cupro-alkalin, comme n'aurait pas manqué de le faire une élimination d'inonose. Pour ces déterminations du pouvoir réducteur urinaire, nous avons adapté à l'urine la technique colorimétrique proposée par FOLIN et WU pour la mesure de la glycémie.

En définitive, le méso-inositol, et éventuellement le scyllitol, retrouvés dans les urines, ne représentent donc qu'une petite fraction de l'inositol absorbé.

Nous avons observé d'autre part que la fréquence d'apparition de la scyllitolurie semblait en rapports avec les surcharges en inositol du régime alimentaire.

Ces faits nous ont conduit à supposer que le scyllitol éliminé pourrait provenir, par deshydrogénation enzymatique réversible, de la réduction du scyllo-méso-inosose, produit intermédiaire du métabolisme, réduction qui fournit concurremment du méso-inositol et du scyllitol. Ces deux isomères seraient ensuite conjointement, et partiellement, éliminés dans l'urine.

Pour résumer l'ensemble de ces hypothèses, nous proposons un schéma susceptible d'expliquer une partie du métabolisme de l'inositol certainement complexe et encore mal connu.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) BEADLE G.-W. — J. Biol. Chem., 1944, **156**, 683-689.
- (2) BIGET P. — Bull. Soc. Chim. biol., 1943, **25**, 108.
- (3) BISERTE G. et BOULANGER P. — Bull. Soc. Chim. biol., 1950, **32**, 601.
- (4) BISERTE G. et BOULANGER P. — Bull. Soc. Chim. biol., 1951, **33**, 1930.
- (5) BOULANGER P., BISERTE G. et COURTOT F. — Bull. Soc. Chim. biol., 1952, **34**, 366.
- (6) COURTOIS J.-E. — Exposés annuels de Biochimie Médicale. Masson édit. Paris 1948.
- (7) COURTOIS J.-E., HELLEU Cl., MALANGEAU P. et PERLES R. — Bull. Soc. Chim. biol., 1956, **38**, 1.017-1.023.
- (8) FIEVET-GUINARD Y. (Mme). — Thèse Doct. Pharm. (Univ.), Paris 1945.
- (9) FLETCHER H.-G., ANDERSON L. et LARDY A.-L. — J. off. org. Chem., 1951, **16**, 1938.
- (10) FLEURY P. — C. R. Acad. Méd., 14 nov. 1950.
- (11) FLEURY P. — Bull. Soc. Chim. biol., 1951, **33**, 1.061.
- (12) FLEURY P. et BALATRE P. — Les Inositols. Masson édit., Paris 1947.
- (13) FLEURY P. et BALATRE P. — Exposés annuels de Biochimie Médicale. Masson édit., Paris 1948.
- (14) FLEURY P., COURTOIS J.-E. et BIEDER A. — Bull. Soc. Chim. 1953, p. 543.
- (15) FLEURY P., COURTOIS J.-E. et JOUANNET A.-L. — Bull. Soc. Chim. biol., 1951, **33**, 1885.
- (16) FLEURY P., COURTOIS J.-E. et MALANGEAU P. — Bull. Soc. Chim. biol., 1953, **35**, 537.
- (17) FLEURY P. et Mlle JOLY. — J. Pharm. Chim., 1937, **26**, 341 et 397.
- (18) FLEURY P. et LANGE J. — J. Pharm. et Chim., 1933, **17**, 313.
- (19) FLEURY P. et MARQUE J. — J. Pharm. et Chim., 1929, **10**, 241.
- (20) FLEURY P. et RECOULES A. — Bull. Soc. Chim. biol., 1949, **31**, 256.
- (21) FLEURY P. et POIROT G. et Mme FIEVET-GUINARD. — C.R. Acad. Sci., 1945, **220**, 664.
- (22) FLEURY P., POIROT G. et Mme FIEVET-GUINARD. — Ann. pharm. fr., 1947, **5**, 209.
- (23) FOLIN et WU. — J. Biol. Chem., 1920, **41**, 367.
- (24) HOLLIDAY J. et ANDERSON L. — J. biol. Chem., 1955, **217**, 797.
- (25) JOLY M. (Mlle). — Thèse Doct. Pharm. (Univ.), Paris 1936.
- (26) JOUANNET A.-L. — Thèse Doct. Pharm. (Univ.), Paris 1953.
- (27) KLUYVER A.-J. et BOEZAARDT A.-G.-J. — Rev. Trav. Chim. Pays-B., 1939, **58**, 956.
- (28) LANDUCCI G.-M. — Bull. Soc. Chim., 1954, p. 124.

- (29) LANGE J. — Thèse Doct. Pharm. (Univ.), Paris 1933.
- (30) LUCAS C.-C. — Canad. J. Bioch. and Physiol., 1956, **34**, 319.
- (31) MALANGEAU P. — Bull. Soc. Chim. biol., 1955, **37**, 756.
- (32) MALANGEAU P. — Thèse Doct. Pharm. (Etat), Paris 1955.
- (33) MALANGEAU P. — Bull. Soc. Chim. biol., 1956, **38**, 729.
- (34) MALANGEAU P. et JOUANNET A.-L. — Bull. Soc. Chim. biol., 1954, **36**, 381.
- (35) MEILLERE G. — J. Pharm. et Chim., 1906, **24**, 241-243.
- (36) MEILLERE G. — C. R. Soc. Biol., 1906, **60**, 226.
- (37) MEILLERE G. — Cité par P. Fleury (12).
- (38) MONTREUIL J. — Colloque Sint Jans Hospital, Bruges 1955.
- (39) MONTREUIL J. et BOULANGER P. — C. R. Acad. Sci., 1953, **236**, 337.
- (40) PEYNAUD E., LAFOURCADE S. et RIBEREAU-GAYON J. — Bull. Soc. Chim. biol., 1956, **38**, 13.
- (41) PHARMACOPEE FRANÇAISE. — (Codex) Edition 1949, p. 414.
- (42) PHARMACOPEE FRANÇAISE. — in.: Ann. pharm. fr., 1952, **10**, 468.
- (43) PHARMACOPEE FRANÇAISE. — (Codex) Supplément 1954 (édition 1949), p. 33.
- (44) PHILLIPS J.-D. et POLLARD A. — Nature, 1953, **71**, 41.
- (45) POSTERNAK Th. — Bull. Soc. Chim. biol., 1951, **33**, 1041.
- (46) POSTERNAK Th. et SCHOPFER W.-H. — Helv. chim. Acta 1950, **33**, 343-349.
- (47) POSTERNAK Th. et SCHOPFER W.-H. — Bull. Soc. Chim. biol., 1951, **33**, 1133.
- (48) RECOULES A. — Thèse Doct. Pharm. (Etat), Paris 1948.
- (49) SCHOPFER W.-H. — Bull. Soc. Chim. biol., 1951, **33**, 1113.
- (50) SCHOPFER W.-H. — Loc. cit. Travaux non publiés.
- (51) SCHOPFER W.-H., POSTERNAK Th et Mlle ROSS M.-L. — Rev. int. Vitaminol., 1948, **20**, 121-128.
- (52) STARKENSTEIN E. — Bioch. Z., 1911, **30**, 56.
- (53) WOOLLEY D.-W. — J. biol. Chem., 1941, **140**, 453.

TABLE DES MATIÈRES

	PAGES
Introduction	5
Note préliminaire	10

PREMIÈRE PARTIE

DOSAGE DE L'INOSITOL EN SOLUTION PURE

CHAPITRE 1 : <i>Dosage volumétrique des inositols par l'acide périodique</i>	14
— Principe	14
— Mode opératoire	15
— Remarques personnelles	17
CHAPITRE 2 : <i>Dosage microbiologique du méso-inositol par le test au Neurospora crassa</i>	18
— Technique du test au <i>Neurospora</i> :	
A — Milieux de culture et technique de préparation	18
B — Dosage	20
— Etude personnelle du test au <i>Neurospora crassa</i> :	
A — Etude des courbes de croissance normales... ..	22
B — Recherche des causes de perturbations observées	28
a) Facteurs extrinsèques	28
(Température, récipients, milieux de culture.)	
b) Facteurs intrinsèques	31
(Entretien et âge des souches, richesse en spores desensemencements.)	
— Conclusions	35
CHAPITRE 3 : <i>Caractérisation des inositols par chromatographie sur papier</i>	36
A — Matériel	36
B — Préparation des chromatogrammes	36
C — Développement	38
D — Révélation	38
E — Interprétation des résultats	39

DEUXIÈME PARTIE

EXTRACTION DES CYCLITOLS URINAIRES PAR LES RESINES ECHANGEUSES D'IONS

	PAGES
CHAPITRE 1 : <i>Technique d'extraction originale de P. MALANGEAU.</i>	42
A — Principe	42
B — Préparation et entretien des colonnes	42
C — Préparation des extraits urinaires	45
CHAPITRE 2 : <i>Mise au point d'une technique d'extraction quantitative satisfaisante</i>	47
A — Etude du comportement des résines échangeuses d'ions vis-à-vis de solutions titrées de méso-inositol	48
(Contrôles sur Permutite « 50 » et sur Déacidite « 300 », rétention de l'inositol par la Déacidite, élution)	48
B — Etude du comportement des résines échangeuses d'ions vis-à-vis d'urines surchargées en méso-inositol	54
(Contrôles de rétention, élution et modifications proposées.)	
CHAPITRE 3 : <i>Protocole opératoire mis au point et suivi pour nos recherches sur l'inosurie physiologique</i>	58
1° Récolte des urines	58
2° Technique d'extraction	58
3° Dosage microbiologique et analyse chromatographique	59

TROISIÈME PARTIE

RECHERCHES SUR L'INOSURIE PHYSIOLOGIQUE CHEZ L'HOMME

CHAPITRE 1 : <i>Déterminations de l'inosurie sur un groupe de sujets normaux des deux sexes et d'âges divers</i>	63
(Résultats et interprétation.)	
CHAPITRE 2 : <i>Etude des variations de l'inosurie chez deux sujets normaux soumis au même régime alimentaire</i>	65

	PAGES
A — Observations (régimes et résultats)	66
B — Interprétation des résultats	70
C — Détermination de l'inosurie chez un nourrisson.	72
CHAPITRE 3 : <i>Essais de surcharge de l'organisme en méso-inositol.</i>	73
1° Etude de l'inosurie après surcharge en inositol ..	73
A — Observations (régimes et résultats)...	74
B — Interprétation des résultats	81
2° Mesures du pouvoir réducteur urinaire avant et après absorption d'inositol	83
A — Technique	83
(Réactifs, défécation de l'urine, dosage, calculs, chiffres normaux.)	
B — Essais personnels	85
(Pouvoirs réducteurs normaux, et après surcharges en inositol, interprétation.)	
3° Essais avec surcharges alimentaires combinées de glucose et d'inositol purs	87
(Technique d'épreuve, résultats et interprétation.)	
4° Etude de la scyllitolurie	89
(Influence des surcharges d'inositol, résultats et interprétation, hypothèses sur le métabolisme du méso-inositol.)	
RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS	93
BIBLIOGRAPHIE	96
TABLE DES MATIÈRES	98

